

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Facoltà di Scienze MM FF NN
Laurea Specialistica in Biologia Marina



INDAGINE SULLA PRESENZA DI *LISTERIA*
MONOCYTOGENES NELLE SEMICONSERVE ITTICHE
A FINE SHELF-LIFE

Relatore: Prof.ssa MARIA BERICA RASOTTO
Dipartimento di Biologia

Correlatore: Dott. GIUSEPPE ARCANGELI
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Laureanda: PAOLA SARTORI

ANNO ACCADEMICO 2006-2007

INDICE

1. Introduzione	pag. 3
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> : l'interazione con gli alimenti e i prodotti ittici	pag. 3
1.2 La malattia	pag. 11
1.3 Comportamenti a rischio	pag. 13
1.4 Prevenzione e trattamento	pag. 13
1.5 Normativa di riferimento	pag. 14
1.6 Valutazione del rischio	pag. 15
2. Scopo	pag. 21
3. Materiali e metodi	pag. 23
3.1 Analisi microbiologiche	pag. 23
3.2 Analisi biomolecolari	pag. 34
3.2.1 Estrazione del DNA	pag. 34
3.2.2 Rivelazione del DNA di <i>Listeria</i> genere in alimenti mediante RealTime PCR	pag. 36
3.2.3 Rivelazione del DNA di <i>L. m.</i> in alimenti mediante RealTime PCR	pag. 38
3.3 Misurazione del pH e dell'acqua libera	pag. 41
3.3.1 pH	pag. 41
3.3.2 Acqua libera	pag. 42
4. Risultati	pag. 43
4.1 Analisi microbiologiche	pag. 44
4.2 Analisi biomolecolari	pag. 46
4.3 Confronto dei risultati	pag. 48
5. Discussione	pag. 51
6. Conclusioni	pag. 55
Bibliografia	pag. 57
Appendice	pag. 65

1. INTRODUZIONE

1.1 *LISTERIA MONOCYTOGENES*: L'INTERAZIONE CON GLI ALIMENTI E I PRODOTTI ITTICI

I batteri del genere *Listeria* appartengono alla famiglia delle Corynebacteriaceae, sono di forma bastoncellare, Gram positivi e non sporigeni. Esistono in natura sei specie di *Listeria*, e precisamente *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi* e *L. monocytogenes* ma solo quest'ultima è la specie maggiormente implicata nei casi di infezione nell'uomo. Per quanto riguarda *L. ivanovi*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* solo raramente causano patologia e *L. grayi* e *L. innocua* sono considerate non patogene.

Come si può notare dalla tabella 1.1, esistono 13 differenti sierotipi di *L. monocytogenes* (*L. m.*), ma i casi umani di malattia da listeriosi sono causati da soli tre sierotipi (4b, 1/2a e 1/2b). Il sierotipo 4b è quello che determina la più alta percentuale di epidemie umane e di casi sporadici ma a tuttoggi non se ne è ancora capita la ragione: nessuno studio ha ancora spiegato il motivo per cui tale sierotipo sia la causa delle epidemie e perchè lo stesso si trovi così raramente all'interno dei cibi. I sierotipi 1/2a, 1/2b e 1/2c sono invece quelli che vengono più spesso trovati all'interno dell'alimento analizzato e non quelli più patogeni (Lovett *et al.*, 1987; Pini and Gilbert, 1988).

Tabella 1.1: classificazione sierologica di *Listeria* spp. Il maggior numero di *L. m.* isolata da pazienti e dall'ambiente sono di tipo 1 o 4 (Hitchins, 2003).

Sierotipi delle specie di <i>Listeria</i>	
<i>Listeria</i> species	Serotypes
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b 4c, 4d, 4e, "7"
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b
<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b

L. m. è un batterio conosciuto da novant'anni ma venne considerato per la prima volta un batterio patogeno per l'uomo solo nel 1981 in Canada dopo il consumo di un'insalata di cavoli contaminati da reflui provenienti da un gruppo di pecore infette (Schlech III *et al.*, 1983; Karunasagar and Karunasagar, 2000). Infatti questo batterio è ubiquitario e i principali habitat sono il suolo, l'acqua, i fanghi di depurazione, i foraggi. Questo causa facilmente contaminazione degli alimenti che diventano di conseguenza il principale veicolo di infezione per l'uomo; inoltre date le caratteristiche di resistenza ai vari fattori ambientali, *L.m.* viene trovata molto spesso nelle industrie alimentari delle carni, del settore lattiero-caseario ed ittico sia a livello ambientale che di materie prime. Essendo un germe psicrotrofo, cresce molto bene a temperature di refrigerazione e per tali motivi i cibi più a rischio sono quelli destinati al consumo crudo o i cosiddetti "ready to eat" (RTE) e tra i prodotti ittici, il pesce affumicato e marinato (Decastelli *et al.*, 2004; Huss *et al.*, 2000).

I fattori che influiscono sulla popolazione microbiologica negli alimenti sono la temperatura, l'acidità (pH), e l'attività dell'acqua; i valori di tutti questi fattori nei prodotti ittici trasformati (semiconserve, affumicati, etc.) sono spesso all'interno del range che permette la crescita di *L. m.* (Rørvik, 2000). Si capisce che è quindi fondamentale e importante comprendere il comportamento del batterio sotto tali condizioni: le risposte potenziali di una popolazione di microrganismi in un ambiente stabile includono la crescita, la sopravvivenza o la morte. Per prevedere come il microrganismo evolve nei prodotti alimentari si devono conoscere i range dei fattori ambientali nei quali il microrganismo può crescere (Ross *et al.*, 2000). I limiti nei quali *L. m.* può sopravvivere (illustrati in tabella 1.2) sono molto ampi ed è proprio per questo che essa viene considerata un pericolo per la salute umana.

Tabella 1.2: limiti di crescita di *L. m.* (Ryser and Marth, 1991; ICMSF, 1996)

^a From Tienungoon (1998).

FATTORI AMBIENTALI	LIMITE MINIMO	LIMITE MASSIMO
Temperatura (°C)	da -2 a +4	~45
% NaCl (& corrispondente aw)	<0.5 (0.91-0.93)	13-16 -
pH	4.2-4.3	9.4-9.5
Acido lattico	0	3.8-4.6 mM di acidi indissociati ^a

In questi ultimi anni sono stati sviluppati degli specifici software che, considerando i diversi valori dei parametri suddetti, forniscono informazioni sul possibile comportamento di *L. m.* Nel settore ittico si segnala il lavoro di P. Dalgaard (2005, 2007). Anche la composizione chimica dell'alimento può influire sullo sviluppo di *L. m.*, così, un substrato carneo dovrà essere diversamente considerato da un substrato ittico o lattiero-caseario o vegetale. Il valore di pH dei prodotti della pesca freschi varia generalmente da 6,5 a 7,0. Durante le prime fasi di degradazione post-mortem si ha la formazione di acido lattico, derivante dalla glicolisi del glicogeno presente nel muscolo, con conseguente diminuzione del valore del pH. A differenza delle carni di mammifero, dove nella fase post mortem c'è una marcata acidificazione, nelle carni di pesce il pH post-mortem è più elevato (vedi tabella 1.3); nei pesci infatti la concentrazione di glicogeno è minore rispetto ai mammiferi e questo comporta una minor produzione di acido lattico e quindi una minor acidificazione (Arcangeli *et al.*, 2003; Sikorski *et al.*, 1990).

Tabella 1.3: valore del pH post-mortem di alcuni prodotti ittici (Tienungoon, 1998).

Prodotto	pH
muscolo di pesce (più specie)	6.6-6.8
bivalvi	6.05
granchi	7.00
gamberetti	6.08
salmone	6.1-6.3

Anche l'attività dell'acqua (a_w), ossia l'acqua libera disponibile per essere impiegata dai microrganismi, e la concentrazione di sali correlata, sono estremamente importanti nel limitare la crescita di *L. m.* Come si nota nella tabella 1.2, *L. m.* può crescere con valori di acqua libera in un range che varia da un limite minimo di 0,91 a un limite massimo superiore ai 0,997 (Dalgaard, 1997). Normalmente i prodotti ittici più salati come le acciughe hanno un valore di acqua libera di 0,6-0,85 (Christian *et al.*, 1980), mentre prodotti come il salmone

affumicato a basso contenuto di sale hanno un valore di acqua libera di circa 0,95-0,97. Si può capire quindi che meno percentuale di sale è presente maggiormente *L. m.* può moltiplicare (Decastelli *et al.*, 2004). Proprio per diminuire questo pericolo, all'interno dei prodotti affumicati viene aggiunto liquido di affumicatura che influenza l'indice di crescita, prevenendo lo sviluppo di *L. m.* (Niedziela *et al.*, 1998), oppure vengono aggiunte flore lattiche starter che competono con *L. m.* Esistono componenti inibitori diversi nei diversi tipi di affumicati: i fenoli in concentrazione di 5-20 ppm riducono marcatamente la crescita di *L. m.* (Membrè *et al.*, 1997), inoltre esistono in commercio isogenoli e butilinchinone terziario richiesti a livelli più elevati (64-512 ppm) per assicurare l'inibizione del patogeno (Payne *et al.*, 1989a; Payne *et al.*, 1989b; Faith *et al.*, 1992; Niedziela *et al.*, 1998).

Questi componenti sono indispensabili se si vuole eseguire un'affumicatura a freddo (67,2°C, a tale temperatura il patogeno non viene ucciso) e quindi se si vuole assicurare la prevenzione dal rischio di incorrere in alte dosi di *L. m.* (Poysky *et al.*, 1997). Capire il comportamento del patogeno in relazione ad una di queste componenti (pH, acqua libera etc.) è complicato, ma ancora più difficile è capire come *L. m.* risponda a interazioni tra due o più fattori. I due comportamenti sono infatti molto diversi: per esempio *L. m.* sopravvive ma non cresce a un pH 4,0 ma se a tale valore si somma una temperatura ottimale per il patogeno, allora si nota come esso inizi a riprodursi (grafico 1.1). Oltre a tali interazioni, molto importante è ricordare che all'aumentare della vita commerciale (*shelf-life*) del prodotto (soprattutto per quanto riguarda gli RTE), tutti i fattori sopra descritti andranno a favorire maggiormente la crescita del batterio. Questo può accadere sia nel caso in cui non vengano rispettati i criteri di mantenimento dell'alimento lungo la catena di produzione e durante la *shelf-life* dello stesso (ad esempio una momentanea interruzione della catena del freddo, l'alterazione della confezione del prodotto, etc.) sia per l'abilità del patogeno di "adattarsi" e sopravvivere alle diverse condizioni ambientali (Gandhi and Chikindas, 2007).

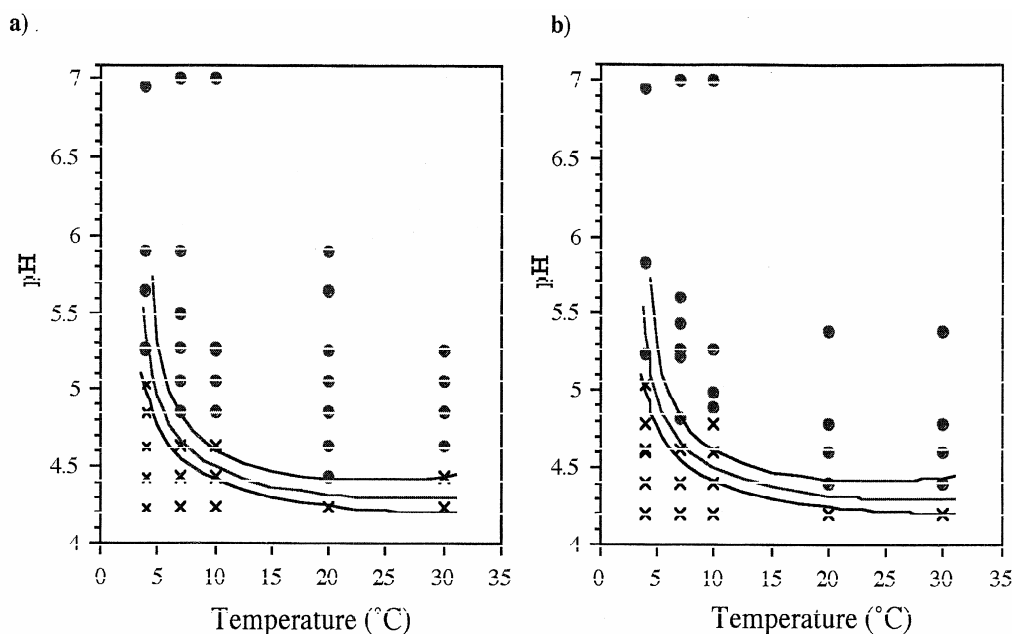


Grafico 1.1: i due grafici (a e b) mostrano la crescita (•) o la mancata crescita (x) di *L. monocytogenes* NCTC 10357 a diversi valori di pH e temperatura (George *et al.*, 1988).

Infatti *L. m.* è un patogeno con l'abilità di adattarsi a un ampio range di condizioni come temperature di refrigerazione, cibi a pH acido e cibi altamente salati (Rocourt and Cossart, 1997):

- sopravvivenza a basse temperature:

La refrigerazione è una delle vie più comuni per incrementare la *shelf-life* degli alimenti, e capire il meccanismo di sopravvivenza e crescita a basse temperature può aiutare a sviluppare controlli più efficaci per diminuire la presenza del patogeno.

L. m. può innescare tre meccanismi per sopravvivere alle basse temperature:

1. modificazione dei lipidi di membrana

I lipidi di membrana di una cellula batterica sono in uno stato fluido e questa situazione plastica è importante per mantenere la fluidità di membrana e le sue funzioni. I cambiamenti in temperatura portano a un'alterazione nella composizione dei lipidi di membrana, che vengono sostituiti con acidi grassi a catena più lunga: questi ultimi mantengono la fluidità ideale di membrana richiesta per l'attività enzimatica e per il trasporto di soluti attraverso le membrane (Annous *et al.*, 1997; Beales, 2004).

2. cambiamenti nell'espressione genica e induzione di proteine "*cold shock*" e acclimatanti.

L. m. produce *cold shock proteins* (Csps) in risposta a un repentino abbassamento di temperatura; inoltre l'organismo produce *acclimation proteins* (Caps) le quali vengono sintetizzate durante la fase di bilanciamento della crescita a basse temperature (Bayles *et al.*, 1996). Questa acclimatazione è accompagnata da cambiamenti nell'espressione genetica: Liu *et al.* (2002) hanno dimostrato che l'incremento nell'espressione di mRNA per proteine di sorveglianza come GroEL, ClpP e ClpB indica che questi enzimi possono essere coinvolti nella degradazione di polipeptidi anormali che si formano durante la crescita del batterio a basse temperature (Liu *et al.*, 2002).

3. accumulo di crioproteine

L. m. è in grado di accumulare soluti compatibili con il citosol come glicine, betaine e carnitine, composti che assumono il ruolo di crioprotettori. Questi stimolano la crescita di cellule sottoposte a stress da freddo, infatti Wemekamp-Kamphuis *et al.* (2004) hanno notato che distruggendo tali transporters osmolitici si riduce la crescita di *L. m.* a basse temperature (Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2004).

- sopravvivenza a pH acidi:

L. m. incontra molto spesso ambienti a pH acido come gli alimenti stessi, durante il passaggio all'interno dell'apparato intestinale dell'ospite e nel fagosoma dei macrofagi (Cotter and Hill, 2003). Il patogeno risponde e sopravvive in questi ambienti a basso pH utilizzando un numero di meccanismi adattativi:

1. induzione di proteine

Anche in questo caso a causa dello stress subito, la cellula va incontro a molti cambiamenti favorendo l'induzione di proteine di protezione (Phan-Thanh and Mahosin, 1999). Phan-Thanh e Mahosin (2000) hanno dimostrato che l'adattamento di *L. m.* a stress acidi ha incrementato anche la resistenza a variazioni di temperatura, a shock osmotico e a stress alcolico, suggerendo che l'adattamento a pH acidi contribuisce a proteggere la cellula contro altri fattori di stress (Phan-Thanh *et al.*, 2000).

Si può capire come questo sistema abbia importanti implicazioni per l'industria alimentare, particolarmente nei processi di trattamento con prodotti acidi (Van Schaik *et al.*, 1999).

2. “pH-omeostasi”

I microrganismi mantengono il loro valore di pH intracitoplasmatico grazie al meccanismo “pH-omeostasi” ottenuto dal trasporto di protoni attraverso la membrana cellulare. In un organismo aerobio, il trasporto attivo di H^+ è accoppiato con il trasporto di elettroni nella catena respiratoria. Dall'altro lato, i batteri anaerobi trasportano all'esterno della cellula i protoni usando l'energia che deriva dall'idrolisi di ATP. *L. m.* è un batterio anaerobio facoltativo che può utilizzare entrambi i processi per la “pH-omeostasi” (Shabala *et al.*, 2002): esiste, in questo batterio, un enzima che viene utilizzato come un canale per la traslocazione di protoni attraverso le membrane utilizzando ATP. Cotter *et al.* (2000) hanno utilizzato un inibitore di tale enzima e hanno notato un'effettiva riduzione nella sopravvivenza del patogeno a pH acidi (Cotter *et al.*, 2000).

3. sistema della glutammato decarbossilasi

L. m. utilizza il sistema della glutammato decarbossilasi (GAD) per sopravvivere a stress acidi, esso è composto di tre geni: *gadA*, *gadB* e *gadC*. I primi due codificano per due glutammato decarbossilasi e il gene *gadC* codifica per un carrier glutammato/ γ -aminobutyrate (Cotter *et al.*, 2001). E' stato ipotizzato che il glutammato venga assimilato dalla cellula mediante uno specifico transporter, e poi decarbossilato nel citoplasma producendo γ -aminobutyrate utilizzando un protone intracellulare. Il γ -aminobutyrate è espulso dalla cellula mediante il carrier localizzato nella membrana cellulare. La perdita del protone incrementa il valore del pH citoplasmatico, inoltre il rilascio di γ -aminobutyrate alza leggermente il pH dell'ambiente esterno andando in questo modo ad aiutare il patogeno nella sopravvivenza a ridotti valori di pH (Small and Waterman, 1998).

- sopravvivenza a stress osmotici

I microrganismi possono “sentire” e adattarsi costantemente ai cambiamenti ambientali, e questa è una parte essenziale della loro crescita e sopravvivenza. La

risposta dei batteri a stress osmotici riguarda tutti i cambiamenti fisiologici e le variazioni nell'espressione dei pattern genici e viene chiamata osmoadattamento (Hill *et al.*, 2002). L'utilizzo del sale, che abbassa l'attività dell'acqua, è uno dei metodi per preservare il cibo usato da tempi memorabili nell'industria alimentare. Bisogna tenere presente però che l'abilità di *L. m.* ad adattarsi e sopravvivere ad alte concentrazioni di sale può creare difficoltà nel controllo del patogeno negli alimenti.

1. induzione di proteine

Uno dei meccanismi usati da *L. m.* per tollerare lo stress salino è il cambiamento nell'espressione genica per incrementare o ridurre la sintesi di svariate proteine. Duche *et al.* (2002a) hanno mostrato che esistono due gruppi di proteine molto simili a quelle menzionate per lo shock termico (Csp e Cap) (Bayles *et al.*, 1996), e le hanno nominate *salt shock proteins* (Ssp) e *stress acclimation proteins* (Sap). Le prime vengono indotte rapidamente ma sovraesprese solo per un breve periodo, mentre le Sap continuano ad essere sovraesprese anche molte ore dopo che le condizioni tornano normali (Duche *et al.*, 2002a).

2. soluti compatibili come osmoprotettivi

Tali soluti sono composti altamente solubili e non avendo carica elettrica, a pH fisiologico, possono essere accumulati ad alte concentrazioni all'interno della cellula senza intaccare alcuna funzione della stessa. Bayles and Wilkinson (2000) hanno dimostrato che la glicina betaina, la prolina betaina, l'acetil carnitina, la carnitina e la γ -butyrobetaina funzionano come osmoprotettivi in *L. m.* La cellula assimila dall'ambiente esterno gli osmoliti come una risposta allo stress osmotico, accelerando così il processo di recupero del bilancio osmotico (Bayles and Wilkinson, 2000).

1.2 LA MALATTIA

La listeriosi appartiene al gruppo di malattie definibili come infezioni alimentari e deriva soprattutto dall'ingestione di cibi contaminati di origine animale, in particolare formaggi molli, latte crudo, o pastorizzato in maniera incompleta, gelati, carne pronta al consumo come ad esempio il pat , carne cruda, salami crudi, pollame crudo, prodotti della pesca e dell'acquacoltura crudi, in salamoia e affumicati. E' da notare che *L. m.* non altera le caratteristiche organolettiche dei cibi per cui diventa ancora pi  pericolosa se non si rispettano i limiti di scadenza dei prodotti lasciati nel frigorifero. Inoltre anche i prodotti vegetali possono essere contaminati a causa del contatto con materiale fecale proveniente da animali infetti, dato che il batterio alberga nell'apparato enterico degli animali, soprattutto mammiferi, e nell'uomo come saprofita. Il contagio interumano   un'evenienza rara, per    possibile la trasmissione madre-feto per via trans-placentare o durante il parto. Gli sporadici casi di listeriosi descritti nei reparti di maternit  sono stati attribuiti a strumenti o materiali che hanno veicolato il batterio.

L. m. pu  invadere l'epitelio gastrointestinale, essere inglobata nei fagosomi dei macrofagi e cos  entrare al suo interno dove   abile a sopravvivere e a moltiplicarsi avendo in tal modo la possibilit  di accedere al cervello o al feto delle gestanti (Norrung, 2000; Salamina *et al.*, 1996; Dalton *et al.*, 1997; Aureli, 1998) (figura 1.1). Alcuni studi (Notermans and Hoornstra, 2000) indicano che ci sono due chiare componenti che contribuiscono alla protezione dall'attivit  batterica: una risposta fisica e non-adattativa offerta dall'epitelio intestinale e una risposta adattativa del sistema immunitario. Questi sistemi agiscono indipendentemente per cui l'effetto totale   dato dall'azione di ognuno separatamente. Quando l'organismo viene esposto al patogeno avvengono degli eventi simultanei: l'esposizione a una grande quantit  di microrganismo causa una perdita di integrit  della barriera intestinale seguita da un abbassamento non specifico delle difese immunitarie e un ritardo nella risposta immunitaria.

Proprio per questo motivo i soggetti pi  vulnerabili sono quelli con un sistema immunitario indebolito, soprattutto individui immunodepressi (pazienti affetti da cancro, con disordini epatici cronici, persone HIV positive, diabetici e individui che hanno subito un trapianto d'organo), per gli anziani, bambini e donne in

gravidanza (Rocourt *et al.*, 2000). Dati francesi mostrano che i pazienti ad alto rischio tra i casi di individui non gestanti sono, in ordine crescente, quelli che hanno effettuato un trapianto (200 casi/100,000), pazienti affetti da cancro (13 casi/100,000) e individui con più di 65 anni di età affetti da malattie note (1.4 casi/100,000) (Rebiere and Goulet, 1993). Un secondo studio eseguito ad Atlanta indica che l'incidenza da listeriosi su pazienti affetti da HIV e pazienti con AIDS è rispettivamente pari a 52 e 115 casi per 100,000 pazienti (Jurado *et al.*, 1993).

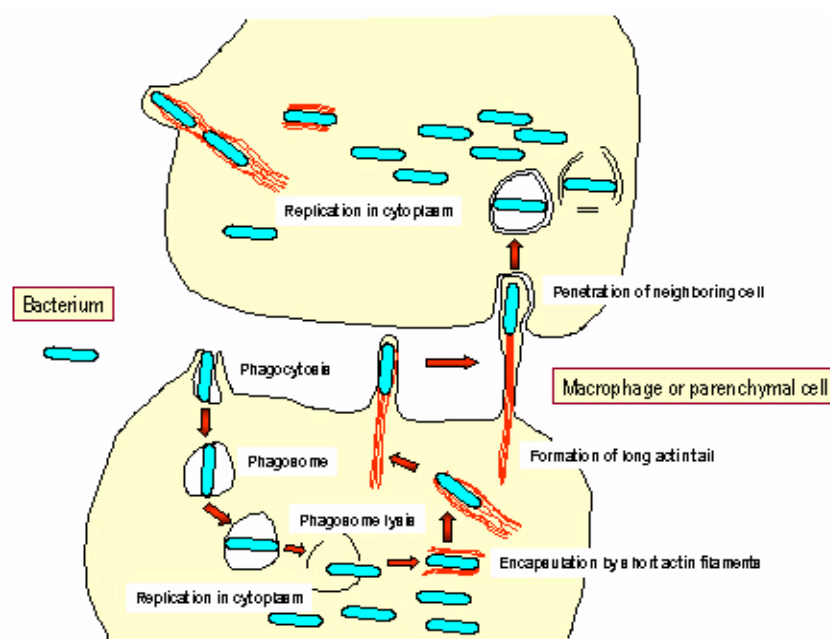


Figura 1.1: mostra l'infezione dei macrofagi o delle cellule parenchimaliche da *L. m.* (tratto da www.bact.wisc.edu).

Negli adulti, *L. m.* ha un particolare tropismo per il sistema nervoso centrale, infatti infezioni delle meningi e dell'encefalo sono abbastanza comuni nel caso di listeriosi. Inoltre si possono avere sintomi gastro-enterici, come diarrea e vomito, durante la malattia mentre molto rari sono le peritoniti, endocarditi e osteomieliti. In un indagine eseguita a Barcellona nel 1992, Skogberg *et al.* hanno riscontrato che la letalità in pazienti immunocompromessi è molto alta e vicina al 38-45% (Skogberg *et al.*, 1992). Nelle gestanti la listeriosi si presenta nel terzo trimestre, l'infezione contratta dalla madre può essere asintomatica o caratterizzata da influenza con febbre, mialgia o emicrania (le infezioni del sistema nervoso

centrale delle gestanti sono veramente rare). Per l'infante invece ci possono essere serie conseguenze come aborto spontaneo, morte fetale, setticemie e meningiti neonatali (Frederiksen and Samuelsson,1992).

Il periodo di incubazione varia da una a sei settimane e questo rende molto difficile risalire all'alimento causa dell'infezione. Data la sua natura batterica, il trattamento della malattia passa attraverso una terapia antibiotica, sia per gli adulti che per i bambini; una cura antibiotica somministrata precocemente a una donna incinta può prevenire la trasmissione della malattia al feto. Si nota quindi come questo patogeno sia in parte in grado di adattarsi ai cambiamenti ambientali, inoltre alcuni studi hanno trovato che *L. m.* è resistente ad alcuni antibiotici come la tetraciclina, gentamicina, penicillina, ampicillina, streptomicina, eritromicina e sulfonamide: la resistenza a suddetti antibiotici dovrà essere tenuta in considerazione per il trattamento di un'eventuale infezione (Charpentier and Courvalin, 1999).

1.3 COMPORTAMENTI A RISCHIO

I comportamenti scorretti che portano a una possibile infezione sono:

- il consumo di alimenti crudi, in particolare prodotti lattiero-caseari, carni e pesce;
- la conservazione in modo non accurato dei cibi refrigerati;
- la preparazione dei cibi senza attenzione alle cross-contaminazioni.

1.4 PREVENZIONE E TRATTAMENTO

La migliore strategia di lotta alla listeriosi passa attraverso un'efficiente prevenzione, che si può facilmente attuare applicando le generali norme di igiene e attenzione previste per tutte le altre infezioni alimentari:

- cottura completa e corretta dei cibi derivati da animali;
- lavaggio accurato delle verdure prima del consumo;
- separazione delle carni crude dalle verdure e dai cibi cotti e pronti al consumo;

- conservazione accurata dei cibi refrigerati;
- pulizia di coltelli, taglieri, superfici e mani dopo la manipolazione di cibi crudi prima della manipolazione di cibi cotti.

In particolare, i soggetti più a rischio, come le donne in gravidanza o le persone immunodepresse, dovrebbero anche:

- consumare prodotti lattiero-caseari pastorizzati;
- consumare i prodotti deperibili in tempi brevi;
- evitare il consumo di prodotti ittici affumicati, a meno che non siano inscatolati in forme che non deperiscono a breve scadenza;
- evitare di mangiare panini contenenti carni o altri prodotti elaborati da gastronomia senza che questi vengano nuovamente scaldati ad alte temperature;
- evitare di contaminare i cibi in preparazione con cibi crudi e/o provenienti dai banconi dei supermercati e delle delicatessen;
- non mangiare formaggi molli se non si ha la certezza che siano prodotti con latte pastorizzato;
- non mangiare paté di carne freschi e non inscatolati;
- mantenere ovviamente una buona pulizia dei frigoriferi (Arcangeli, 2006; Arcangeli *et al.*, 2003; www.epicentro.iss.it).

1.5 NORMATIVA DI RIFERIMENTO

Negli ultimi anni l'opinione pubblica ha riversato un grande interesse verso le infezioni e le tossinfezioni di origine alimentare, e spesso tra i media si assiste a vere e proprie criminalizzazioni di un alimento, o di una categoria di alimenti, qualora risultino coinvolti in eventi epidemici. La Normativa europea con le ultime emanazioni relative al campo alimentare, ha ampiamente affrontato questa problematica, sottolineando come “i prodotti alimentari non devono contenere microrganismi, né loro tossine o metaboliti, in quantità tali da rappresentare un rischio inaccettabile per la salute umana” (Reg. CE 2073/2005), fissando i criteri microbiologici che devono essere rispettati per le diverse categorie di alimenti (Boni *et al.*, 2006). Nei “Consideranda” del Reg. 2073, il CSMVSP (comitato scientifico per le misure veterinarie in relazione con la salute pubblica) ha emesso

un parere separato sulla *L. m.*, in cui ha raccomandato di stabilire come obiettivo una concentrazione di *L. m.* negli alimenti inferiore a 100ufc/g (Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 2005).

I criteri di sicurezza alimentare infatti impongono un limite non superiore alle 100 ufc/g per gli alimenti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. m.*, diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali. Anche i prodotti con $\text{pH} \leq 4,4$ o acqua libera $\leq 0,92$, i prodotti con $\text{pH} \leq 5,0$ e acqua libera $\leq 0,94$, i prodotti con un periodo di conservabilità inferiore a 5 giorni sono automaticamente considerati appartenenti a questa categoria. Inoltre dal punto di vista istituzionale, la listeriosi rientra nel gruppo di malattie per le quali sono stati stabiliti sia negli Stati Uniti che in Europa reti di sorveglianza sulla sicurezza alimentare con obbligo di denuncia (Regolamento CE n.178/2002 del 28 gennaio 2002: allerta comunitaria). Queste reti, volte a individuare focolai di infezione e determinarne la causa, permettono di agire sia ritirando i prodotti dal mercato che adottando le necessarie misure nei confronti degli impianti di produzione e informando la popolazione a rischio (Arcangeli, 2006; www.epicentro.iss.it).

Altre normative riguardanti *L. m.* sono:

- Normative aspecifiche Igiene Alimenti, art. 5 L. 283/1962;
- O.M. 7 dicembre 1993 (G.U. n.291 del 13 dicembre 1993);
- D.M. 15 dicembre 1990, "Sistema informativo delle malattie infettive e diffusive", classe IV dell'allegato, (G.U. n.6 del 8 gennaio 1991);
- DIRETTIVA 2003/99/ 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 (G.U. L. 325/31 del 12 dicembre 2003).

1.6 VALUTAZIONE DEL RISCHIO

Come detto in precedenza, la garanzia della sicurezza alimentare è obiettivo dichiarato dell'Unione europea, i cui termini sono esplicitati nel Libro bianco, documento edito nel 2000, ispiratore dell'attuale normativa del settore alimentare. Non si dovrebbe intendere più per sicurezza alimentare l'assenza di rischi, ma bisognerebbe porre in atto le misure per ridurre l'impatto sul consumatore,

certamente attraverso modifiche dei processi di produzione, ma anche mediante un'informazione corretta e trasparente, finalizzata anche a modificare i comportamenti sbagliati del consumatore relativi alla manipolazione dei cibi e alle loro diete alimentari.

La sicurezza può essere garantita attraverso tre fasi dipendenti l'una dall'altra:

- 1) produzione di un sistema informativo sulla sicurezza alimentare;
- 2) analisi del rischio sulla base delle informazioni raccolte;
- 3) comunicazione con il consumatore, sulla base delle conclusioni raccolte grazie ai due punti precedenti.

1) Il sistema informativo rappresenta un sistema con lo scopo di garantire la sicurezza, nel quale devono essere raccolti e ordinati dati e informazioni collegati alla produzione alimentare, inoltre deve rendere possibile la quantificazione dei rischi collegati a ogni prodotto e quindi l'attivazione negli stabilimenti delle azioni efficaci nel controllare e diminuire i rischi.

2) La sicurezza dei prodotti alimentari è garantita principalmente da misure di prevenzione, quali la messa in atto di pratiche corrette in materia d'igiene e di procedure basate sui principi dell'analisi del rischio e dei punti critici di controllo dei processi produttivi, cioè l'HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) (Boni *et al.*, 2006).

Al fine di una corretta applicazione del sistema HACCP è necessario conoscere e gestire livelli di rischio non teorici, ma quantitativamente determinati presenti negli stabilimenti e nei prodotti in corso di produzione e commercializzazione; risulta quindi opportuno fissare criteri microbiologici che definiscano l'accettabilità dei processi produttivi e non solo dei prodotti. Le elementari conoscenze nell'ambito della sicurezza alimentare suggeriscono che, per limitare al massimo la contaminazione di un alimento con flore indesiderate, bisogna fare particolare attenzione a tutti quei fenomeni di cross-contaminazione dei prodotti finiti, tanto più quando nel processo di produzione esistono fasi in grado di mantenere entro livelli accettabili i rischi associati alla contaminazione da parte dei microrganismi patogeni. Risulta pertanto fondamentale programmare l'attività produttiva secondo il modello del flusso di processo unidirezionale evitando che accidentali contatti tra materie prime, semilavorati e prodotti finiti, o che il non

corretto comportamento degli operatori determini la contaminazione crociata dei prodotti alimentari.

Con queste premesse è chiaro come le procedure di pulizia e sanificazione di tutti i locali e strumenti di lavorazione, o più in generale di tutte le superfici che all'interno dello stabilimento possono venire direttamente o indirettamente in contatto con gli alimenti, devono garantire la massima efficacia per prevenire che *L. m.* come tanti altri patogeni, possano costituire delle nicchie di sopravvivenza negli ambienti di produzione e da qui fungere da agenti di ricontaminazione del prodotto. Negli ultimi anni si è quindi mirato a valutare e quantificare il rischio di possibile trasmissione del microrganismo al consumatore attraverso la contaminazione del prodotto e allo stesso tempo raccogliere elementi per porre in atto negli stabilimenti azioni tese a ridurre la contaminazione dei prodotti, operando correzioni nei processi di trasformazione e di gestione delle procedure di sanificazione.

Considerato che *L. m.* viene considerata come un importante indicatore della situazione igienico sanitaria dei locali e delle attrezzature di lavorazione, diviene prioritario puntare al deciso miglioramento delle condizioni di gestione igienico sanitaria delle zone di lavorazione, sia tramite attività di maggiore sensibilizzazione del personale, sia anche attraverso controlli mirati a “cercare” il problema, piuttosto che a nascondere con l'obiettivo di puntare ad abbassare progressivamente il numero di strutture in cui siano presenti *L. m.*

Questo permetterebbe di raggiungere livelli di prevalenza progressivamente inferiori, tali da garantire un effettivo minor rischio per la salute del consumatore (Boni *et al.*, 2006).

Esistono varie fasi nella valutazione del rischio:

➤ ESPOSIZIONE DELLO SCOPO DELLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO (Notermans and Hoornstra, 2000)

Per ciascuna attività di valutazione del rischio può essere stabilito uno specifico scopo che permetterà di avere una chiara visione della valutazione e gli obiettivi prefissati. All'interno di questa prima fase infatti possono essere introdotti alcuni punti fondamentali come la comparsa e la ricomparsa del patogeno, l'interesse pubblico e la necessità di stabilire opzioni di controllo.

➤ IDENTIFICAZIONE DEL PERICOLO (Notermans and Hoornstra, 2000)

Questa seconda parte è l'identificazione di *L. m.* come organismo capace di causare effetti sulla salute e presente in un particolare alimento o gruppo alimentare.

➤ VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE (Notermans and Hoornstra, 2000)

Valutare il livello del patogeno nell'alimento al tempo della consumazione.

I fattori di interesse nella valutazione dell'esposizione sono:

- informazioni sulla contaminazione iniziale del materiale crudo;
- potenziali di cross-contaminazione e ri-contaminazione;
- condizioni di immagazzinamento;
- caratteristiche dell'alimento;
- etc.

➤ CARATTERIZZAZIONE DEL PERICOLO

La caratterizzazione del pericolo è la valutazione della natura e degli effetti negativi associati a *L. m.* all'interno degli alimenti.

➤ CARATTERIZZAZIONE DEL RISCHIO

La caratterizzazione del rischio è la stima della probabilità che avvengano effetti negativi sulla salute umana; è basata sia sull'identificazione e caratterizzazione del pericolo sia sulla valutazione dell'esposizione. La maggior parte delle persone sane possono consumare alimenti con alte cariche di *L. m.* (maggiori di 100 milioni di cellule) senza contrarre la malattia. Al contrario, in persone sensibili (feti, anziani o immunodepressi), una dose più piccola (minore di 10000 cellule) può provocare malattia in forma grave e, in circa il 30% dei casi, anche la morte (Nuvoloni *et al.*, 2005; Sumner *et al.*, 2004).

➤ PRODUZIONE DI UN RENDICONTO FINALE

Il rendiconto finale è un documento che si può effettuare anche per una maggior trasparenza del procedimento.

Oggi non esiste realtà di produzione di semiconserve ittiche REPFED (Refrigerate processed Foods of Exstended durability) che non consideri la possibilità del pericolo dato da *L. m.* (Arcangeli *et al.*, 2003).

2. SCOPO

Lo scopo della presente tesi è la valutazione dello stato di sicurezza sanitaria delle semiconserve ittiche relativo alla presenza di *Listeria monocytogenes*, ricercata con metodo microbiologico qualitativo secondo le norme ISO in prodotti confezionati, conservati a temperatura di refrigerazione ed analizzati alla fine della durata commerciale. Oltre a una prova di tipo qualitativo è stata effettuata un'indagine microbiologica di tipo quantitativo, sempre secondo le norme ISO, del patogeno eventualmente presente e una prova di tipo biomolecolare per verificare la presenza di questi organismi anche non vitali.

3. MATERIALI E METODI

3.1 ANALISI MICROBIOLOGICHE

Per analisi microbiologica si intende l'individuazione dei microrganismi presenti in un campione, generalmente congiunta ad una valutazione quantitativa (www.asalab.it). Esistono però delle fasi principali che precedono l'identificazione batterica quali la raccolta, la preparazione del campione, la semina in brodo o in terreno agarizzato di isolamento.

La coltura pura offre tutti gli elementi di indagine per la successiva caratterizzazione, quali:

- l'aspetto morfologico delle colonie isolate;
- l'aspetto morfologico al microscopio a fresco o dopo colorazione;
- la ricerca delle attività metaboliche rilevabili con test biochimici;
- la ricerca della presenza del patogeno attraverso la biologia molecolare.

Per quanto riguarda la raccolta del campione, per la presente tesi sono state utilizzate 5 unità campionarie per ogni campione prelevato; il numero delle unità campionarie è definito dalle metodiche ufficiali per ogni tipo di patogeno.

A questo punto si è proceduto con l'**analisi microbiologica qualitativa**, ossia con la ricerca di *L. m.* a 37°C secondo la procedura di prova ISO 11290-1:1996/Amd 1 2004. L'analisi è basata sul rilevamento di colonie caratteristiche in piastra a 37°C previo arricchimento selettivo.

a) attrezzature e strumenti

- bunsen
- pipette sterili da 1 ml
- pipettatrice automatica
- ansa e ago di plastica monouso
- vetrini
- microscopio ottico
- termostati a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e $37 \pm 1^\circ\text{C}$
- dispositivi di protezione individuale (DPI).

b) soluzioni e reagenti

- Half Fraser Broth (HFB) (225 ml in bottiglie)

- Fraser Broth (FB) (10 ml in provette)
- piastre di ALOA Agar Listeria (ALOA)
- piastre di Listeria selective medium-Oxford (OX)
- piastre di Agar Sangue (AS)
- piastre di Tryptone Soya Agar + 0,6% di estratto di lievito (TSA+YE)
- API Listeria-BioMerieux
- Soluzione fisiologica sterile (SF)
- Acqua ossigenata (perossido d'idrogeno a 10 volumi (3%(m/m)))
- coloranti per colorazioni di GRAM
- olio per immersione
- ceppo di riferimento di *L. monocytogenes* ATCC 13932 (brodocoltura primaria congelata)
- ceppo di riferimento di *L. innocua* ATCC 33090 (brodocoltura primaria congelata)
- ceppo di riferimento di *L. ivanovii* ATCC 19119 (brodocoltura primaria congelata)
- ceppo di *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 per Camp Test
- ceppo di *Rodococcus equi* ATCC 6939 per Camp Test.

c) preparazione del campione

Omogeneizzare 25 g di alimento di ciascuna unità campionaria in 225 ml di brodo primario di arricchimento selettivo Half Fraser Broth (HFB).

d) esecuzione dell'analisi

Incubare l'omogenato in termostato a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ per $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$.

Nota: durante l'incubazione può svilupparsi una colorazione nera.

Trasferire 0,1 ml di HFB, indipendentemente dalla colorazione, in 10 ml di brodo secondario di arricchimento selettivo Fraser Broth (FB) e incubare a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per $48 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$.

Strisciare un'ansata in ALOA ed in OX direttamente da HFB, dopo l'incubazione a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ per $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$.

Strisciare un'ansata in ALOA ed in OX da FB, indipendentemente dalla colorazione, in modo da ottenere colonie ben separate.

Incubare le piastre di ALOA e OX capovolte a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$; se la crescita è scarsa e non si osservano colonie o se non sono presenti colonie tipiche,

reincubare per ulteriori $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$. Le colonie sospette di *L. m.* in ALOA si presentano verde-azzurre, circondate da un alone opaco. Le colonie sospette di *Listeria spp.* in OX si presentano nero-verdastre, diametro 2 mm, con centro nero infossato, circondate da alone nero.

Procedere quindi con il Test dell'emolisi: prelevare almeno 5 colonie sospette (tutte, se presenti in numero inferiore) da ciascuna piastra di ciascun arricchimento selettivo, stemperarle in 1 ml di soluzione fisiologica e strisciarne un'ansata in AS, in modo da ottenere colonie ben separate.

Contemporaneamente seminare per infissione un controllo positivo di *L. m.* ed un controllo negativo di *L. innocua*.

Incubare a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

Dopo l'incubazione esaminare i ceppi test e i controlli.

L. m. mostra una limitata zona trasparente (β -emolisi) attorno al punto di infissione, più visibile rimuovendo la patina batterica intorno all'inoculo; *L. innocua* non mostra emolisi; *L. seeligeri* mostra una debole zona di emolisi; *L. ivanovii* solitamente mostra un'ampia e delineata zona trasparente di β -emolisi.

Esaminare le piastre in trasparenza comparandole con le colture di controllo.

Procedere all'identificazione biochimica (vedi punto e) di una colonia emolitica.

Procedere con le altre colonie, una alla volta, se la prima è negativa, fino a testarle tutte o fino a quando non si ha una positività.

Strisciare la colonia sospetta emolitica in TSA+YE e incubare a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 h o fino a quando la crescita sia soddisfacente (le colonie tipiche di *Listeria* sono convesse, 1-2 mm di diametro, incolori e opache con bordo intero).

e) identificazione biochimica

Effettuare le seguenti prove da colonie di una coltura pura in TSA+YE:

- Colorazione di Gram (bacilli sottili e corti gram+): stemperare una colonia cresciuta in piastra, in una goccia di acqua sterile depositata su un vetrino portaoggetti da microscopio. Distendere per strisciamento con l'ansa su tutta la superficie del vetrino, in modo da formare una sottile pellicola del campione; lasciare asciugare e fissare con veloci passaggi sulla fiamma del bunsen (il fissaggio uccide i microrganismi senza alterarne la morfologia). Colorare per 1 minuto il preparato, fissato alla fiamma, con violetto di genziana fenicato di Nicolle al 2% (o di cristalvioletto). Allontanare l'eccesso

di colore e, senza lavare, coprire col liquido di Lugol facendo agire per un minuto; lavare il preparato con acqua, asciugare con carta bibula e versare a gocce alcool assoluto sul vetrino (l'alcool allontana il colore). Aggiungere alcool fin quando il preparato non cede più il violetto di genziana. Lavare e colorare per 10 secondi con soluzione idroalcoholica di safranina allo 0,25%, o con fucsina diluita 1:10 (o 0,03%) per 30 secondi, per ottenere la colorazione di contrasto. Lavare e asciugare.

Osservare al microscopio con l'obiettivo ad immersione 100x: i batteri gram positivi come *Listeria* appaiono viola-blu scuri (figura 3.1); questo è dovuto al fatto che tali batteri presentano un basso contenuto in lipidi della membrana, la quale non perde la permeabilità dopo il lavaggio con alcool trattenendo il colore scuro del cristalvioletto.

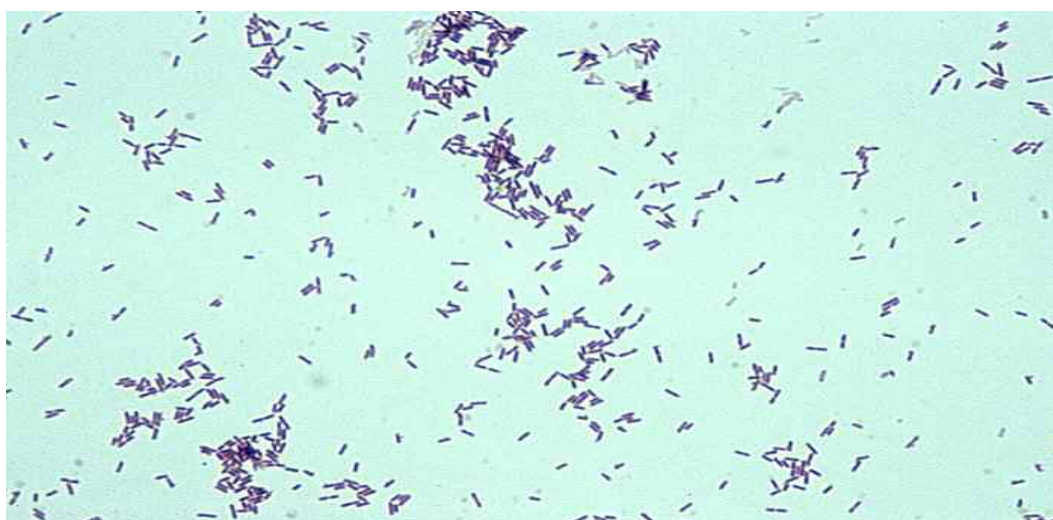


Figura 3.1: immagine di *Listeria* spp. colorata Gram

- Catalasi (+): porre una goccia di acqua ossigenata (conservata al riparo dalla luce) su un vetrino; stemperarvi una colonia prelevata dalla piastra di TSA+YE. La comparsa di bolle di gas indica la presenza dell'enzima catalasi: reazione positiva.
- Zuccheri: l'utilizzazione dello Xilosio e del Ramnosio è testata mediante la lettura dei rispettivi pozzetti dell'API Listeria (vedi sotto).
- API Listeria: è un sistema standardizzato per l'identificazione delle varie specie di *Listeria* che utilizza test miniaturizzati insieme a una base di dati specifica. Distribuire sulla vaschetta del kit Listeria circa 3 ml di acqua

distillata o demineralizzata per creare un ambiente umido e mettere la galleria nella vaschetta di incubazione. Servendosi di una pipetta prelevare alcune colonie ben isolate utilizzando preferibilmente colonie giovani (18-24 ore) e inserirle in una fiala di API Suspension Medium (2 ml). Distribuire tale sospensione batterica nelle microprovette evitando la formazione di bolle, richiudere la vaschetta di incubazione e incubare per 18-24 ore a $36^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ in aerobiosi. Dopo il periodo indicato aggiungere 1 goccia di reattivo ZYM B nella prima celletta e procedere alla lettura facendo riferimento alla tabella di lettura del test (immagine 3.1) annotando le reazioni +/- sulla scheda per la registrazione dei risultati. L'identificazione della specie di *Listeria* è ottenuta mediante un profilo numerico: sulla scheda dei risultati, i test sono separati in gruppi di tre e ad ognuno viene attribuito un valore pari a 1, 2 o 4. All'interno di ogni tripletta vengono sommati fra di loro i valori corrispondenti alle sole reazioni positive, ottenendo così un numero di 4 cifre che costituisce il profilo numerico corrispondente alla specie di *Listeria*.

The image shows an API Listeria test result card. At the top, there is a CE mark and a reference field (REF.). Below this, the card is divided into two main sections. The left section contains a grid of test results for various biochemical tests. The right section contains a box for the identification result.

Test	Result	Value
DIM	-	1
ESC	+	2
α MAN	+	4
DARL	+	1
XYL	-	2
RHA	+	4
MDG	+	1
RIB	-	2
G1P	-	4
TAG	-	1
β HEM	+	1

The numerical profile is 6510, which corresponds to *Listeria monocytogenes*.

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Immagine 3.1: esempio di tabella di lettura dell' API Listeria

- **CAMP test:** strisciare i ceppi di *Staphylococcus aureus* e *Rodococcus equi* verticalmente in singola linea su una piastra di AS in modo tale che le due colture siano parallele e diametralmente opposte (vedi figura 3.2). E' richiesto un inoculo sottile che può essere ottenuto tenendo l'ansa o l'ago perpendicolare con l'agar.

Strisciare orizzontalmente la colonia da testare perpendicolarmente alle colture di *Staphylococcus aureus* e *Rodococcus equi* in modo da lasciare da queste una distanza di 1 o 2 mm.

Più colonie possono essere testate sulla stessa piastra.

Contemporaneamente strisciare le colture di controllo di *L. m.*, *L. innocua*, *L. ivanovii* e incubare a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 h.

Un alone di β -emolisi più evidente all'intersezione del ceppo da testare con ciascuna delle colture di *Staphylococcus aureus* e *Rodococcus equi* è considerato essere una reazione positiva.

La reazione positiva con *Rodococcus equi* si evidenzia con un ampio alone (da 5 a 10 mm) di emolisi "a punta di freccia". La reazione è negativa se un piccolo alone debolmente emolitico si estende solo per 1 mm circa dall'intersezione del ceppo da testare con la crescita di *Rodococcus equi*.

La reazione positiva con *Staphylococcus aureus* appare come un piccolo alone di emolisi pronunciata che si estende solo per 2 mm circa dal ceppo da testare, all'interno dell'alone debolmente emolitico dello *Staphylococcus aureus*.

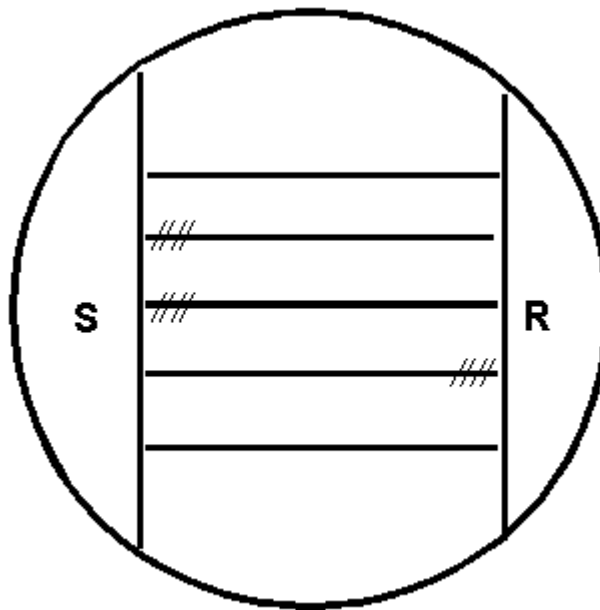


Figura 3.2: CAMP test per *L. m.*: le linee orizzontali rappresentano i ceppi da testare e/o le colture di controllo di *L. m.*, *L. innocua*, *L. ivanovii*; le linee verticali invece rappresentano i ceppi di *Staphylococcus aureus* (S) and *Rhodococcus equi* (R). Le lineette oblique indicano la regione di emolisi.

f)interpretazione dei risultati

I caratteri biochimici evidenziati da *Listeria spp.* sono descritti in tabella 3.1.

Tabella 3.1: caratteri biochimici delle specie di *Listeria spp.*

Specie	Emolisi	Produzione di acido		CAMP test	
		Ramnosio	Xilosio	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi subsp. grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi subsp. murrayi</i>	-	V	-	-	-
v: reazione variabile					
(+): reazione debole					
+: > 90% di reazioni positive					
-: reazione negativa					

g) espressione dei risultati

In base ai risultati dell'identificazione, indicare la presenza o assenza di *L. m.* in 25 g di prodotto.

Se vengono isolate altre specie di *Listeria*, queste vengono inserite ugualmente all'interno dei risultati.

h) riferimenti bibliografici

- ISO 11290-1: 1996 - Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection medium
- Amendment 1 (ISO 11290-1: 1996)- 2004 – Modification of the isolation media and haemolysis test, and inclusion of precision data
- ISO 7218 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations
- DPR 14 gennaio 1997 n° 54 (G.U.12.03.97 n° 59)
- C., Cantoni, L., Provara, S., d'Aubert (settembre 1992): Validità di un nuovo sistema per l'identificazione di *Listeria spp.*. Industrie Alimentari XXXI, 757-759
- POS BAT 01 Produzione dei terreni culturali

- POS BAT 02 Preparazione dei campioni, sospensione iniziale e diluizioni decimali per l'analisi microbiologica di matrici alimentari
- POS BAT 03 Colorazione di Gram
- PG 13/6 Validazione dei metodi di prova per analisi batteriologiche degli alimenti
- Fascicolo di validazione BAT51V
- Istruzioni operative del kit commerciale API Listeria-BioMerieux

Se il campione risulta positivo alla prova qualitativa si deve procedere con l'**analisi microbiologica quantitativa**: numerazione di *L. m.* a 37°C (conta in piastra), procedura di prova ISO 11290-2: 1998/Amd 1 2004).

Anche in questo caso l'analisi è basata sul rilevamento di colonie caratteristiche in piastra a 37°C previo arricchimento selettivo, inoltre verrà determinato il numero di unità formanti colonia (UFC) del patogeno in una determinata quantità di campione.

a)attrezzature e strumenti

- bunsen
- pipette sterili da 1ml
- pipettatrice automatica
- spatole a L sterili
- ansa e ago di plastica monouso
- vetrini
- microscopio ottico
- termostato a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ per $37 \pm 1^\circ\text{C}$
- dispositivi di protezione individuale (DPI).

b)soluzioni e reagenti

- acqua peptonata
- piastre di ALOA Agar Listeria (ALOA)
- piastre di Agar Sangue (AS)
- piastre di Tryptone Soya Agar + 0,6% di estratto di lievito (TSA+YE)
- API Listeria-BioMerieux
- soluzione fisiologica
- acqua ossigenata (perossido d'idrogeno a 10 volumi (3%(m/m)))

- coloranti per colorazioni di GRAM
- olio per immersione
- ceppo di riferimento di *L. monocytogenes* ATCC 13932 (brodocoltura primaria congelata)
- ceppo di riferimento di *L. innocua* ATCC 33090 (brodocoltura primaria congelata)
- ceppo di riferimento di *L. ivanovii* ATCC 19119 (brodocoltura primaria congelata)
- ceppo di *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 per Camp Test
- ceppo di *Rodococcus equi* ATCC 6939 per Camp Test.

c)prelievo del campione, allestimento della sospensione iniziale e delle diluizioni successive

Preparare la sospensione iniziale omogeneizzando 10 g di alimento in 90 ml di acqua peptonata tamponata e lasciare la sospensione iniziale per $1\text{ h} \pm 5\text{ min}$ a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, per rivitalizzare i microorganismi stressati.

Preparare una serie di diluizioni successive.

d)esecuzione dell'analisi

Predisporre sul banco di lavoro due piastre di ALOA per ciascuna delle diluizioni da seminare in base al tipo di alimento e contrassegnarle con il numero della diluizione dell'inoculo.

Utilizzando una pipetta sterile, versare nel centro di ciascuna piastra di terreno 0,1 ml della sospensione iniziale; procedere versando 0,1 ml delle appropriate diluizioni nel centro di ciascuna diluizione.

Distribuire uniformemente per spatolamento senza toccare i bordi della piastra, utilizzando una spatola sterile per ciascuna diluizione o la stessa spatola partendo dalla diluizione più alta.

Come previsto dal Regolamento 2073/2005 e quando è necessario stimare bassi numeri di *L. m.*, il limite di numerazione può essere abbassato di un fattore 10 esaminando 1 ml di sospensione iniziale. In tal caso, distribuire con la spatola 1 ml di inoculo sulla superficie di una piastra di ALOA da 140 mm o di tre piastre di ALOA di 90 mm di diametro. Preparare tutto in doppio (2 piastre da 140 mm o 6 piastre da 90 mm).

Incubare le piastre di ALOA in posizione capovolta, in pile di massimo sei piastre, distanti tra loro almeno 25 mm, a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 3 h; se la crescita è scarsa e non si osservano colonie o se non sono presenti colonie tipiche, reincubare per ulteriori 24 ± 3 h. Le colonie sospette di *L. m.* in ALOA si presentano verde-azzurre, circondate da un alone opaco.

Contare tutte le colonie presunte essere *Listeria spp.* in ciascuna piastra contenente meno di 150 colonie caratteristiche o non caratteristiche.

e) conferma di *Listeria spp.* e identificazione biochimica

Selezionare almeno 5 colonie sospette o tutte, se presenti in numero inferiore, da ciascuna piastra contenente meno di 150 colonie presuntive, se possibile, in due diluizioni successive ed eseguire la conferma biochimica come per l'analisi qualitativa vista sopra (test dell'emolisi, colorazione di Gram, catalasi, zuccheri, API *Listeria*, CAMP test).

f) espressione dei risultati

Dopo la conferma delle colonie sospette, il numero di colonie di *L. m.* presenti, **n**, va elaborato usando la seguente formula:

$$n = (b/A) \times C$$

dove: b= è il numero di colonie in accordo con i criteri di identificazione

C= è il numero totale di colonie contate

A= è il numero di colonie testate

Arrotondare **n** ad un numero intero.

Utilizzare il foglio di calcolo excel "Conta e incertezza" per la verifica dell'accettabilità dei conteggi e per il calcolo del risultato.

Verificare l'accettabilità dei conteggi delle due piastre alla medesima diluizione, mediante il calcolo del fattore di copertura sperimentale, Kp, per entrambe le diluizioni considerate e la proporzionalità dei conteggi ottenuti alle due diverse diluizioni, mediante l'indice di dispersione sperimentale.

Per il calcolo procedere come segue:

- piastre contenenti meno di 150 colonie di *L. m.*, una delle quali almeno 15 *L. m.*

Calcolare il numero N di *L. m.* per grammo di prodotto utilizzando la seguente formula:

$$N = \sum a / (V_{(n1 + 0,1 n2)} * d)$$

dove:

$\sum a$ = somma delle colonie di *L. m.* calcolate dopo la conferma, in tutte le piastre considerate a due diluizioni successive, una delle quali contenenti almeno 15 colonie identificate.

V = volume di inoculo utilizzato in ciascuna piastra in 1 ml

n1 = numero di piastre considerate nella diluizione inferiore

n2 = numero di piastre considerate nella diluizione superiore

d = fattore di diluizione della diluizione più bassa considerata

Esprimere come risultato il numero (UFC) di *L. m.* per grammo compreso tra 1,0 e 9,9 moltiplicato per 10^x , dove x è l'appropriato esponente di 10.

- stima di numeri ridotti di colonie.

Se le due piastre in cui è stata seminata la sospensione iniziale contengono un numero di colonie inferiore a 15 di *L. m.*, calcolare la media aritmetica **m** delle colonie contate sulle due piastre.

Esprimere il risultato come segue:

$$\text{numero stimato di } L. m. \text{ UFC/g} = m / (d * V)$$

dove:

d = fattore di diluizione della sospensione iniziale

V = volume di inoculo utilizzato in ciascuna piastra in ml

- assenza di colonie

Se nelle due piastre in cui è stata seminata la sospensione iniziale non sono presenti colonie, esprimere il risultato come segue:

$$\text{meno di } = 1 / (d * V) \text{ UFC/g di } L. m.$$

dove:

d = fattore di diluizione della sospensione iniziale

V = volume di inoculo utilizzato in ciascuna piastra in ml.

g) riferimenti bibliografici

- ISO 11290-1: 1998 - Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection medium
- Amendment 1 (ISO 11290-1: 1998)- 2004 – Modification of the enumeration medium
- ISO 7218 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations
- Regolamento CE n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 – Criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari (G.U. Unione Europea L 338/1 del 22/12/05)
- C., Cantoni, L., Provara, S., d'Aubert (settembre 1992): Validità di un nuovo sistema per l'identificazione di *Listeria spp.*. Industrie Alimentari XXXI, 757-759
- POS BAT 01 Produzione dei terreni colturali
- POS BAT 02 Preparazione dei campioni, sospensione iniziale e diluizioni decimali per l'analisi microbiologica di matrici alimentari
- POS BAT 03 Colorazione di Gram
- PG 13/6 Validazione dei metodi di prova per analisi batteriologiche degli alimenti
- Fascicolo di validazione BAT51V
- Istruzioni operative del kit commerciale API Listeria-BioMerieux.

3.2 ANALISI BIOMOLECOLARI

Contemporaneamente alle analisi microbiologiche sono state eseguite analisi biomolecolari di estrazione del DNA a partire dal brodo primario di arricchimento selettivo e di rivelazione del DNA di *L. m.* mediante PCR real time.

3.2.1 Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA si è utilizzato il DNeasy Blood and Tissue Kit il quale contiene il protocollo di purificazione del DNA totale da tessuti animali (Spin-Column Protocol).

a)attrezzature e strumenti

- micropipette
- eppendorf sterili da 1,5 ml
- DNeasy Mini spin column
- vortex
- etanolo (96-100%)
- provette per la microcentrifuga
- microcentrifuga refrigerata
- termomixer a 56°C

b)soluzioni e reagenti

- Buffer ATL
- Buffer AL
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- proteinase K
- Buffer AE

c)procedimento

Prelevare dal brodo primario di arricchimento selettivo HFB 1 ml di sospensione e inserirlo in una eppendorf da 1,5 ml di capienza.

Centrifugare per 3 minuti a 14.000 rpm ed eliminare successivamente il surnatante con una micropipetta; risospendere in 1 ml di acqua sterile, vortexare e ricentrifugare per tre minuti a 14.000 rpm.

Addizionare 180 µl di Buffer ATL e 20 µl di proteinasi K, vortexare per circa 10 secondi e incubare a 56°C per circa 1-3 ore fino a quando il materiale non si è completamente lisato.

Vortexare per 15 secondi e addizionare 200 µl di Buffer AL, 200 µl di etanolo (96-100%) e rivortexare per alcuni secondi.

Pipettare la soluzione all'interno della "DNeasy Mini spin column" e centrifugare per 1 minuto a 8.000 rpm; addizionare 500 µl di Buffer AW1 e centrifugare nuovamente per 1 minuto a 8.000 rpm.

Addizionare 500 µl di Buffer AW2 e centrifugare per 3 minuti a 14.000 rpm; inserire poi 200 µl di Buffer AE e incubare a temperatura ambiente per circa 1 minuto e quindi centrifugare per 1 minuto a 8.000 rpm.

Il campione è pronto quindi per le successive prove di identificazione del DNA di *Listeria spp.* e del DNA di *L. m.*

3.2.2Rivelazione del DNA di *Listeria* genere in alimenti mediante RealTime PCR

La procedura ha lo scopo di definire il percorso analitico per individuare la presenza di materiale genetico appartenente a *Listeria* genere mediante analisi RealTime PCR di tipo qualitativo mediante l'uso di primers specifici.

a)attrezzature e strumenti

- cappe biologiche a flusso laminare
- ultracentrifuga refrigerata
- LightCycler 2.0
- LightCycler Capping Tool
- congelatore -20°C +/- 5°C
- congelatore -80°C
- pipette monocanale
- eppendorf da 1,5 ml e 0,5 ml
- capillari LightCycler 0,2 ml
- blocco refrigerante con adattatori per centrifuga
- puntali con filtro fino a 10 µl, 20 µl, 200 µl e 1000 µl

b)soluzioni e reagenti

- LightCycler Foodproof Listeria Genus Detection Kit (Roche) N° cat. 03 535 614 001

c)modalità operative

- amplificazione mediante RealTime PCR per l'identificazione di *Listeria spp.*

Preparare la master mix "Listeria genere": per ogni campione, per i controlli positivi e per quelli negativi, preparare la mix di reazione secondo le indicazioni della seguente tabella:

REAGENTE	CONCENTRAZIONE FINALE	µl x 1 REAZIONE
LightCycler foodproof Listeria Genus Master Mix	1X	13 µl
LightCycler foodproof Listeria Genus Enzyme Solution	1X	1 µl
LightCycler foodproof Listeria Genus Internal	1X	1 µl

Control	
VOLUME TOTALE	15 µl
VOLUME CAMPIONE DNA	5 µl
VOLUME FINALE DI REAZIONE	20 µl

Programmare il Light Cycler secondo le seguenti condizioni di amplificazione:

PROGRAMMA PCR LISTERIA GENERE	
PRE-INCUBAZIONE	40°C / 2 min
DENATURAZIONE INIZIALE	95°C / 10 min
DENATURAZIONE	95°C / 0 sec
ANNEALING	59°C / 30 sec
AMPLIFICAZIONE	72°C / 5 sec
NUMERO DI CICLI	45
RAFFREDDAMENTO	40°C / 30 sec

▪ rilevazione del prodotto di amplificazione

Durante e dopo le reazioni di amplificazione i dati vengono elaborati dal software Lightcycler versione 4.0.

d)interpretazione dei risultati

Si devono confrontare i risultati relativi al Controllo Interno di Amplificazione e al campione incognito: nel caso quest'ultimo risulti negativo per *Listeria* genere il Controllo Interno di Amplificazione dev'essere positivo, per escludere gli effetti di eventuali inibizioni o di una mancata o insufficiente estrazione. Nei campioni positivi il Controllo Interno di Amplificazione può essere negativo.

E' necessario interpretare i risultati secondo la seguente tabella:

Listeria genere	Controllo Interno di Amplificazione	Risultato
Positivo	Positivo	Positivo
Negativo	Positivo	Vero negativo
Positivo	Negativo	Positivo
Negativo	Negativo	Falso negativo (risultato non accettabile)

f)espressione dei risultati

La positività all'analisi indica la presenza nel campione testato di materiale genetico appartenente al genere *Listeria*.

g)referimenti bibliografici

- H. Berrada, J.M. Soriano, Y. Picó, J. Mañes, 2006. Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR. International Journal of Microbiology, 202-206.
- J., O'Mahony, C., Hill, 2004. Rapid Real-Time PCR Assay for Detection and Quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in Artificially Contaminated Milk. Applied and Environmental. Microbiology, 4561-4568.

3.2.3 Rivelazione del DNA di *L. m.* in alimenti mediante RealTime PCR

Questa procedura ha lo scopo di definire il percorso analitico per individuare la presenza di materiale genetico appartenente a *L. m.* mediante analisi RealTime PCR di tipo qualitativo, in campioni già riscontrati positivi alla presenza di *Listeria spp.* mediante test microbiologico e biomolecolare (PCR) visti sopra.

L'uso di primers specifici permette di identificare *L. m.* attraverso l'impiego di primers per il gene *mpI*.

a) attrezzature e strumenti

- cappe biologiche a flusso laminare
- ultracentrifuga refrigerata
- LightCycler 2.0
- LightCycler Capping Tool
- congelatore -20°C +/- 5°C
- congelatore -80°C
- pipette monocanale
- eppendorf da 1,5 ml e 0,5 ml
- capillari LightCycler 0,2 ml
- blocco refrigerante con adattatori per centrifuga
- puntali con filtro fino a 10 µl, 20 µl, 200 µl e 1000 µl

b) soluzioni e reagenti

- acqua bidistillata sterile
- InstaGene Matrix (BioRad n° cat. 732-6030)
- LightCycler Foodproof *Listeria monocytogenes* Detection Kit (Roche) N° cat. 03 535 614 001

c) modalità operative

- amplificazione mediante RealTime PCR per l'identificazione di *L. m.*

Preparare la master mix "Listeria genere": per ogni campione, per i controlli positivi e negativi, preparare la mix di reazione secondo le indicazioni della seguente tabella:

REAGENTE	CONCENTRAZIONE FINALE	µl x 1 REAZIONE
Acqua bidistillata sterile per PCR	1X	10 µl
LightCycler foodproof Listeria monocytogenes Detection Mix	1X	2 µl
LightCycler foodproof Listeria monocytogenes Enzyme Master mix	1X	2 µl
Uracil-DNA Glicosilasi, heat labile	1X	1 µl
VOLUME TOTALE		15 µl
VOLUME CAMPIONE DNA		5 µl
VOLUME FINALE DI REAZIONE		20 µl

I parametri per la reazione di amplificazione nel termocicizzatore sono:

PROGRAMMA PCR LISTERIA MONOCYTOGENES	
PRE-INCUBAZIONE	37°C / 2 min
DENATURAZIONE INIZIALE	95°C / 10 min
DENATURAZIONE	95°C / 0 sec
ANNEALING	59°C / 30 min
AMPLIFICAZIONE	72°C / 5 sec
NUMERO DI CICLI	45
RAFFREDDAMENTO	40°C / 30 sec

- rilevazione del prodotto di amplificazione

Anche in questo caso durante e dopo le reazioni di amplificazione i dati vengono elaborati dal software Lightcycler versione 4.0.

d)interpretazione dei risultati

Confrontare i risultati relativi al Controllo Interno di Amplificazione e al campione incognito: nel caso quest'ultimo risulti negativo per *L. m.*, il Controllo Interno di Amplificazione dev'essere positivo, per escludere gli effetti di eventuali

inibizioni o di una mancata o insufficiente estrazione. Nei campioni positivi il Controllo Interno di Amplificazione può essere negativo.

E' necessario interpretare i risultati secondo la seguente tabella:

<i>Listeria monocytogenes</i>	Controllo Interno di Amplificazione	Risultato
Positivo	Positivo	Positivo
Negativo	Positivo	Vero negativo
Positivo	Negativo	Positivo
Negativo	Negativo	Falso negativo (risultato non accettabile)

f)espressione dei risultati

La positività all'analisi indica la presenza nel campione testato di materiale genetico appartenente alla specie *L. m.*

g) riferimenti bibliografici

- H. Berrada, J.M. Soriano, Y. Picó, J. Mañes, 2006. Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR. *International Journal of Microbiology*, 202-206.
- J., O'Mahony, C., Hill, 2004. Rapid Real-Time PCR Assay for Detection and Quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in Artificially Contaminated Milk. *Applied and Environmental. Microbiology*, 4561-4568.

3.3 MISURAZIONE DEL pH E DELL'ACQUA LIBERA

3.3.1 pH

Il pH (dal latino *pondus hydrogenii* ovvero potenziale dell'idrogeno) è una scala di misura dell'acidità di una soluzione acquosa e viene definito come il logaritmo negativo della concentrazione di ioni idrogeno, cioè il logaritmo di 1 diviso per la concentrazione idrogenionica. Il pH solitamente assume valori compresi tra 0 (acido forte) e 14 (base forte); al valore intermedio di 7 corrisponde la condizione di neutralità, tipica dell'acqua pura a 25°C.

In questo lavoro, per ogni campione esaminato è stata eseguita la rilevazione del pH grazie allo strumento definito “misuratore di pH” (figura 3.3). Solitamente questo strumento viene utilizzato per misurare il pH di un liquido, ma in questo caso si avevano a disposizione sonde particolari adatte alla misura del pH di campioni solidi o semi-solidi. Generalmente tali sonde sono costituite da un elettrodo a vetro che misura la differenza di potenziale elettrico su due lati di una sottile membrana di vetro posta all'estremità dell'elettrodo: tale differenza di potenziale è legata alla differenza tra le concentrazioni degli ioni idrogeno all'interno e all'esterno della membrana.



Figura 3.3: esempio di “misuratore di pH” digitale, da tavolo.

Oltre a questo tipo di sonda si utilizza anche una sonda di temperatura, la quale corregge la lettura dell'elettrodo in funzione dell'effettiva temperatura del campione.

3.3.2Acqua libera

I microrganismi necessitano di acqua per il loro metabolismo; ogni substrato per consentire la crescita deve presentare una fase acquosa che funge da solvente per gli enzimi microbici (Galli Volonterio, 2005). L'acqua libera (a_w) di un substrato è rappresentata pertanto dall'acqua presente non legata chimicamente e quindi effettivamente disponibile per gli enzimi microbici. Essa rappresenta il rapporto fra la tensione di vapore dell'acqua del substrato e quella dell'acqua pura a uguale temperatura e pressione:

$$a_w = P/P_0$$

La misura dell'acqua libera quindi è molto importante in quanto è responsabile dell'attivazione microbica che a sua volta causa delle reazioni degradative enzimatiche (la maggior parte delle reazioni enzimatiche viene rallentata a valori inferiori a 0,8) o chimiche (ad esempio la reazione di imbrunimento del prodotto viene rallentata da alti valori di a_w) .

Come già affermato il patogeno preso in considerazione in questo lavoro può sopravvivere solo a intervalli determinati di a_w , ossia sopra valori di 0.91. Per misurare il valore di a_w è stato utilizzato uno strumento composto da un contenitore-sonda che serve per l'alloggiamento e la misurazione del campione e da un lettore portatile che funziona a batteria.

Il campione da analizzare viene posto all'interno del contenitore-sonda chiuso ermeticamente; parte dell'acqua presente nel campione evapora consentendo al sensore di rilevare il valore di acqua libera. La risposta dello strumento avviene normalmente dopo circa quaranta minuti a seconda del tipo di campione e del valore di umidità relativa, cioè il tempo richiesto affinché il vapore acqueo liberato dal substrato saturi la cella.

4. RISULTATI

In questo lavoro sono stati analizzati, a fine *shelf-life*, 56 campioni costituiti da diverse tipologie di prodotti ittici elencati in tabella 4.1.

Tabella 4.1: elenco dei campioni alimentari analizzati e delle relative date di fine *shelf-life*.

NUMERO CAMPIONE	FINE SHELF-LIFE	TIPOLOGIA PRODOTTO
1	09/02/2007	salmone affumicato preaffettato
2	12/02/2007	cozze condite marinate
3	12/02/2007	salmone affumicato
4	24/02/2007	insalata di mare
5	27/02/2007	carpaccio di polpo
6	27/02/2007	gamberetti
7	05/03/2007	insalata di mare
8	05/03/2007	insalata di mare
9	05/03/2007	salmone affumicato
10	05/03/2007	nature di pesce spada
11	05/03/2007	nature di salmone
12	05/03/2007	insalata di mare
13	05/03/2007	insalata di mare
14	15/03/2007	gamberetti grigi

15	20/03/2007	insalata di mare
16	20/03/2007	tonno affumicato affettato sottovuoto
17	22/03/2007	branzino affumicato affettato sottovuoto
18	26/03/2007	filetti marinati
19	28/03/2007	insalata di polpo
20	05/04/2007	calamaretti conditi
21	05/04/2007	insalata di mare
22	05/04/2007	insalata di polpo
23	05/04/2007	filetti di sgombro
24	05/04/2007	surimi marinato
25	08/04/2007	filetti di sgombro con pepe
26	10/04/2007	peperoni ripieni tonno
27	17/04/2007	seppioline grigliate
28	18/04/2007	gamberetti
29	18/04/2007	polpo alla mediterranea
30	18/04/2007	insalata di mare alla mediterranea
31	20/04/2007	polpo
32	20/04/2007	insalata di mare
33	20/04/2007	filetti di alici marinate
34	21/04/2007	carpaccio di pesce spada
35	21/04/2007	filetti di sgombro grigliati
36	21/04/2007	salmone affumicato
37	24/04/2007	carpaccio di salmone marinato
38	24/04/2007	carpaccio di polpo
39	24/04/2007	salmone affumicato
40	30/04/2007	sugo fresco al tonno
41	04/05/2007	filetti di sardine marinate
42	09/05/2007	sugo fresco spada
43	14/05/2007	insalata di polpo
44	14/05/2007	bocconcini di sarda marinati
45	14/05/2007	anguilla marinata
46	15/05/2007	sugo fresco gamberetti e zucchine
47	16/05/2007	filetti di aringhe affumicate
48	20/05/2007	insalata di mare
49	21/05/2007	insalata di mare
50	21/05/2007	frittura marinata
51	23/05/2007	sugo fresco verace
52	24/05/2007	insalata di mare
53	26/05/2007	pesce spada affettato affumicato sottovuoto

54	05/06/2007	insalata di polpo
55	07/06/2007	filetti di pesce azzurro
56	11/06/2007	insalata di mare

4.1 ANALISI MICROBIOLOGICHE

Per quanto riguarda l'**analisi microbiologica qualitativa**, i risultati mostrano 5 campioni con almeno un'unità campionaria positiva per *L. monocytogenes* e 51 campioni con esito negativo: quindi solo nel 9% dei prodotti analizzati vi è la presenza del patogeno (figura 4.1).

L'unico caso in cui è stato riscontrato anche un esito positivo per la **prova microbiologica quantitativa** è il campione numero 11 (nature di salmone) per il quale è stato trovato un valore di 220 UFC/g.

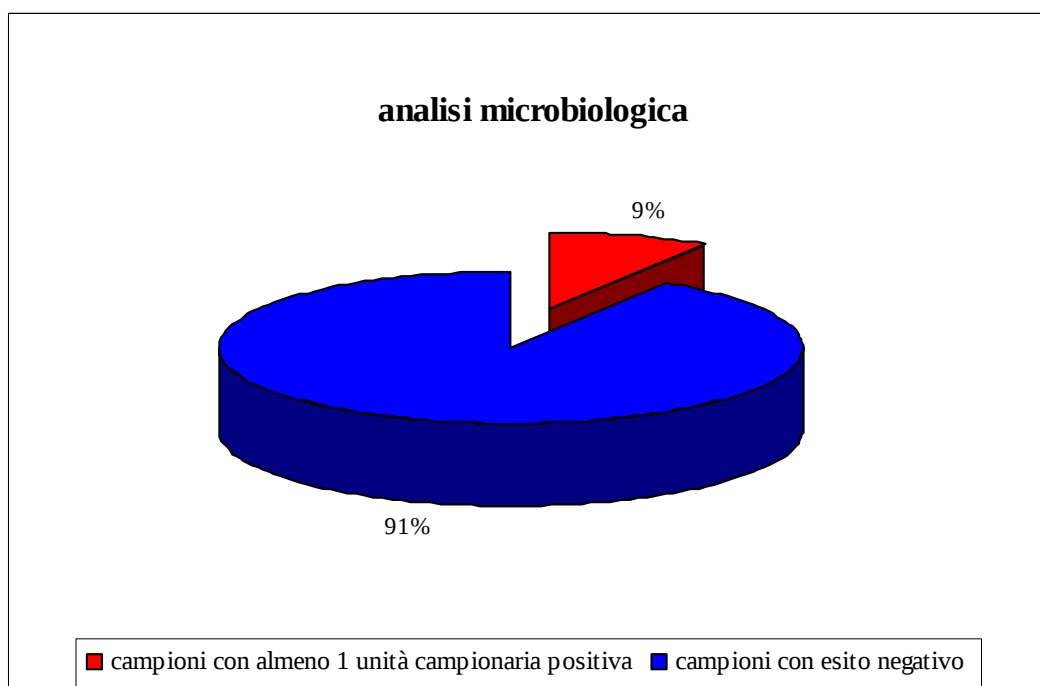


Figura 4.1: composizione percentuale dei campioni positivi e negativi alla prova microbiologica qualitativa.

Nella tabella 4.2 sono stati riportati i soli casi positivi all'analisi qualitativa, ognuno dei quali suddivisi in 5 unità campionarie: nel campione numero 1 si può notare la presenza, oltre alla specie patogena, di *L. innocua*.

Non sono state riscontrate altre specie di *Listeria*.

Tabella 4.2: esiti microbiologici qualitativi (sono stati riportati i campioni con almeno un'unità campionaria positiva). Il simbolo "I" rappresenta *L. innocua*, "X" *L. monocytogenes*.

N° CAMPIONE	TIPOLOGIA PRODOTTO	ESITO MICROBIOLOGICO QUALITATIVO				
		1	2	3	4	5
1	salmone affumicato preaffettato in busta	I		X		
6	gamberetti			X		X
11	nature di salmone	X				
14	gamberetti grigi		X			
35	filetti sgombro grigliati				X	

Durante le analisi microbiologiche sono state eseguite anche le misurazioni del **pH** e dell'**acqua libera** di almeno un'unità campionaria per campione: nella tabella 4.3 sono stati riportati i due tipi di valori relativi ai soli campioni positivi. I valori di pH sono compresi tra 4,9 e 6,1 mentre quelli di a_w tra 0,90 e 0,98.

Nella tabella in appendice sono riportati tutti i valori dei campioni analizzati compresi quelli negativi.

Tabella 4.3: valori di pH e a_w dei campioni positivi all'analisi microbiologica qualitativa.

NUMERO CAMPIONE	VALORE DI pH	VALORE DI a_w
1	5,7	0,90
6	4,9	0,98
11	5,7	0,91
14	6,1	0,95
35	5,1	0,96

4.2 ANALISI BIOMOLECOLARI

La ricerca di DNA di *Listeria* genere (figura 4.2) ha dato 13 campioni con almeno un'unità campionaria positiva (23%), in otto di questi 13 campioni è stata confermata la presenza di *L. monocytogenes* (tabella 4.3).

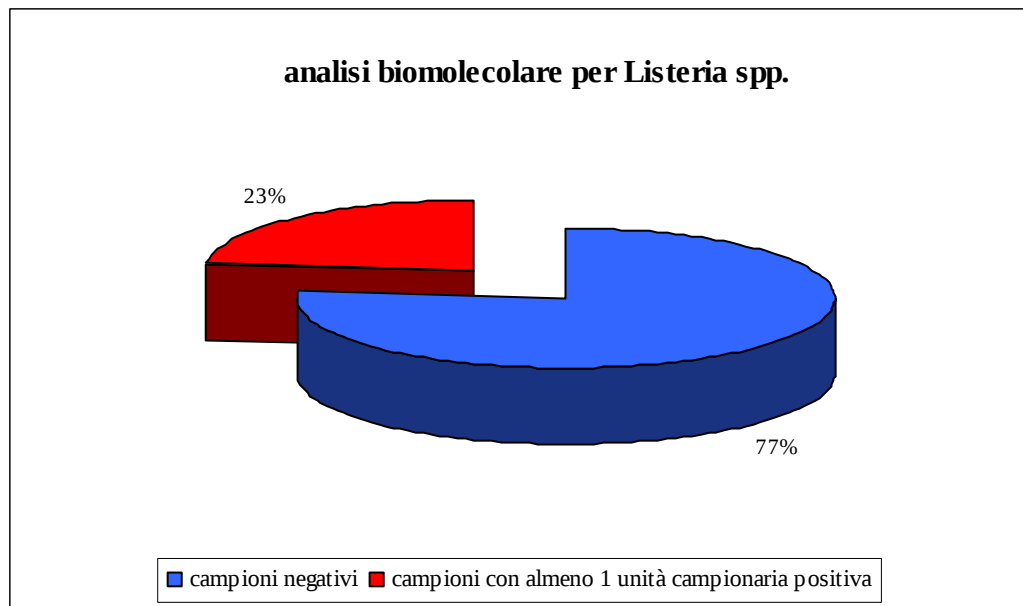


Figura 4.2: composizione percentuale dei campioni positivi e negativi alla prova biomolecolare per *Listeria* spp.

Tabella 4.3: esiti biomolecolari (sono stati riportati i campioni con almeno un'unità campionaria positiva). Il simbolo "X" rappresenta sia *Listeria* spp. sia *L. monocytogenes*.

N° CAMPIONE	TIPOLOGIA PRODOTTO	ESITO BIOMOLECOLARE PER <i>LISTERIA</i> SPP.					ESITO BIOMOLECOLARE PER <i>L.</i> <i>MONOCYTOGENES</i>				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
11	nature di salmone	X					X				
15	insalata di mare	X				X					X
16	tonno affumicato affettato sottovuoto					X					X
17	branzino affumicato affettato sottovuoto				X	X				X	X
19	insalata di polpo	X					X				
30	insalata di mare alla mediterranea	X					X				
35	filetti di sgombro grigliati				X					X	
36	salmone affumicato	X				X					
41	filetti di sardine marinate				X						
48	insalata di mare	X	X	X	X		X	X	X	X	
49	insalata di mare				X						
50	frittura marinata			X		X					
52	insalata di mare	X									

Anche in questo caso sono stati riportati in tabella 4.4 i valori di **pH** e **a_w**: i primi hanno valori compresi tra 3,4 e 6,6, i valori di acqua libera sono compresi tra 0,90 e 0,97.

Tabella 4.4: valori di pH e a_w dei campioni positivi all'analisi biomolecolare per *Listeria spp.*

NUMERO CAMPIONE	VALORE DI pH	VALORE DI a _w
11	5,7	0,91
15	4,2	0,93
16	5,7	0,92
17	6,6	0,90
19	4,3	0,97
30	4,1	0,96
35	5,1	0,96
36	6	0,96
41	4	0,92
48	4	0,96
49	3,4	0,96
50	4,5	0,95
52	4,5	0,96

4.3 CONFRONTO DEI RISULTATI

Nel confronto fra analisi microbiologiche e analisi biomolecolari (tabella 4.5) si possono riscontrare fondamentalmente tre tipi di risultati:

- **campioni positivi all'analisi microbiologica e negativi all'analisi biomolecolare**

I campioni che fanno parte di questa categoria sono il numero 1 (salmone affumicato preaffettato) , il numero 6 (gamberetti) e il numero 14 (gamberetti grigi).

- **campioni negativi all'analisi microbiologica e positivi all'analisi biomolecolare**

Tra questi troviamo i campioni numero 15 (insalata di mare), 16 (tonno affumicato), 17 (branzino affumicato), 19 (insalata di polpo), 30 (insalata di mare), 36 (salmone affumicato) e 48 (insalata di mare), per i quali oltre a un riscontro biomolecolare positivo per *Listeria spp.* abbiamo avuto la conferma della presenza di *L. monocytogenes*.

Per i campioni numero 41 (filetti di sardine marinate), 49 (insalata di mare), 50 (frittura marinata) e 52 (insalata di mare) invece il microorganismo presente non faceva parte della specie patogena.

▪ **campioni positivi a entrambe le analisi**

Il numero 11 (nature di salmone) e il numero 35 (filetti di sgombero) sono risultati positivi all'analisi microbiologica, a quella biomolecolare per *Listeria spp.* e a *Listeria monocytogenes*; inoltre, come già detto, il campione numero 11 è risultato positivo anche alla prova microbiologica quantitativa.

Tabella 4.5: confronto tra i risultati microbiologici e biomolecolari (sono stati riportati i campioni con almeno un'unità campionaria positiva). Il simbolo "X" rappresenta sia *Listeria spp.* sia *L. monocytogenes*, il simbolo "I" rappresenta *L. innocua*.

N° CAMPIONE	TIPOLOGIA PRODOTTO	ESITO MICROBIOLOGICO QUALITATIVO					ESITO BIOMOLECOLARE PER <i>LISTERIA SPP.</i>					ESITO BIOMOLECOLARE PER <i>L. MONOCYTOGENES</i>				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	salmone affumicato preaffettato in busta	I		X												
6	gamberetti			X		X										
11	nature di salmone	X					X					X				
14	gamberetti grigi		X													
15	insalata di mare						X				X					X
16	tonno affumicato affettato sottovuoto										X					X
17	branzino affumicato affettato sottovuoto									X	X				X	X

19	insalata di polpo						X					X				
30	insalata di mare alla mediterranea						X					X				
35	filetti di sgombro grigliati				X					X					X	
36	salmone affumicato						X				X					
41	filetti di sardine marinate									X						
48	insalata di mare						X	X	X	X		X	X	X	X	
49	insalata di mare									X						
50	frittura marinata								X		X					
52	insalata di mare						X									

5. DISCUSSIONE

Lo scopo del presente lavoro è stato verificare lo stato di sicurezza sanitaria delle semiconserve ittiche per quel che concerne la presenza di *Listeria monocytogenes*, con analisi effettuate a fine *shelf-life*. Le analisi eseguite hanno rilevato un solo campione (numero 11) che non rientra nei limiti previsti dalla Normativa comunitaria, a dimostrazione che le norme di autocontrollo inserite nel piano HACCP vengono rispettate dai produttori. Il fatto di avere avuto solo un campione positivo sopra i limiti di legge e 5 campioni positivi alla sola prova qualitativa sul totale esaminato (9% del totale), induce a pensare che, anche se *L. m.* fosse presente nell'alimento al momento della sua lavorazione, il mantenimento costante delle condizioni interne assicura il blocco della crescita del patogeno.

Nella tabella 5.1 vengono raggruppati i valori di pH e acqua libera misurati per i campioni positivi all'analisi microbiologica qualitativa: fattori inibitori però, aggiunti al prodotto affumicato e, ad esempio, il mantenimento della catena del freddo, rallentano la crescita del microrganismo durante la *shelf-life* del prodotto alimentare (Payne *et al.*, 1989a; Payne *et al.*, 1989b; Faith *et al.*, 1992; Niedziela *et al.*, 1998). Viceversa, la presenza di un range di condizioni come pH e a_w favorevoli, l'assenza di componenti inibitori e una bassa percentuale di sale all'interno dell'alimento portano a un aumento della velocità di crescita di *L. m.* (Decastelli *et al.*, 2004). Alcuni esempi: il campione numero 6 (tabella 5.1), ad esempio, ha un valore di a_w (= 0,98) che favorisce la crescita del batterio e un valore di pH abbastanza basso (pH = 4,9) che può andare a limitarne la proliferazione. Il caso opposto lo abbiamo per il campione numero 1 il quale ha un valore di a_w molto basso (a_w = 0,90) che contrasta l'azione di un pH abbastanza elevato (pH = 5,7) che potrebbe favorire la crescita del patogeno.

Oltre alla sicurezza sanitaria, durante lo svolgimento delle analisi, ci si è posta la domanda se in un futuro i metodi microbiologici, che prevedono tempi di esecuzione molto lunghi e procedimenti costosi, potessero essere sostituiti dalle analisi biomolecolari.

Tabella 5.1: valori di pH e a_w dei campioni positivi all'analisi microbiologica qualitativa.

NUMERO CAMPIONE	TIPOLOGIA PRODOTTO	VALORE DI pH	VALORE DI a_w
1	salmone affumicato preaffettato	5,7	0,90
6	gamberetti	4,9	0,98
11	nature di salmone	5,7	0,91
14	gamberetti grigi	6,1	0,95
35	filetti sgombero grigliati	5,1	0,96

Analizzando i risultati, il punto più rilevante è che non tutti i campioni positivi all'analisi microbiologica sono poi risultati positivi a quella biomolecolare (tabella 5.2), come i campioni numero 1 (salmone affumicato preaffettato), 6 (gamberetti) e 14 (gamberetti grigi): questo può essere dovuto alla scarsa sensibilità del metodo biomolecolare od alla presenza di fattori inibitori nel prodotto alimentare. Già da questa prima analisi si può capire quindi che una sostituzione dei metodi porterebbe a errori nella valutazione sulla qualità microbiologica. Per quanto riguarda invece i campioni numero 15 (insalata di mare), 16 (tonno affumicato), 17 (branzino affumicato), 19 (insalata di polpo), 30 (insalata di mare), 36 (salmone affumicato), 41 (filetti di sardine marinate), 48 e 49 (insalate di mare), 50 (frittura marinata) e 52 (insalata di mare), essi sono risultati positivi alla prova biomolecolare e negativi a quella microbiologica (tabella 5.2). In questo caso l'analisi molecolare ha rilevato DNA facente parte del genere *Listeria* e in molti casi della specie patogena, ma dato che l'analisi microbiologica ha dato esito negativo il DNA presente è sicuramente materiale genetico di microrganismi morti.

I valori di pH e a_w (tabella 5.3) relativi a tali prodotti, infatti, inducono a pensare che, pur essendo presente una rilevante contaminazione iniziale da *L. m.*, nelle fasi successive al confezionamento dell'alimento, i microrganismi non hanno trovato condizioni idonee alla loro sopravvivenza e proliferazione. Ad esempio il campione numero 17 ha un valore di acqua libera molto basso ($a_w = 0,90$) che limita decisamente le possibilità di moltiplicazione e di sopravvivenza del

patogeno; lo stesso effetto negativo per *Listeria*, dato però dal pH acido, si è riscontrato nel campione numero 49 per il quale è stato misurato un valore di 3,4.

Tabella 5.2: confronto tra i risultati microbiologici e biomolecolari. Il simbolo “X” rappresenta sia *Listeria spp.* sia *L. monocytogenes*, il simbolo “I” rappresenta *L. innocua*.

N° CAMPIONE	ESITO MICROBIOLOGICO QUALITATIVO					ESITO BIOMOLECOLARE PER <i>LISTERIA SPP.</i>					ESITO BIOMOLECOLARE PER <i>L. MONOCYTOGENES</i>				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	I		X												
6			X		X										
11	X					X					X				
14		X													
15						X				X					X
16										X					X
17									X	X				X	X
19						X					X				
30						X					X				
35				X					X					X	
36						X				X					
41									X						
48						X	X	X	X		X	X	X	X	
49									X						
50								X		X					
52						X									

Un caso soglia è invece il campione numero 35 il quale è risultato positivo alle prove biomolecolari e all’analisi microbiologica qualitativa: i valori di pH e a_w sono compresi all’interno del range di crescita (pH = 5,1; a_w = 0,96) ma la loro interazione non è stata così efficace da permettere a *L. m.* di superare la soglia di sensibilità del metodo microbiologico quantitativo.

Tabella 5.3: valori di pH e a_w dei campioni positivi all'analisi biomolecolare per *Listeria spp.*

NUMERO CAMPIONE	TIPOLOGIA PRODOTTO	VALORE DI pH	VALORE DI a_w
11	nature di salmone	5,7	0,91
15	insalata di mare	4,2	0,93
16	tonno affumicato affettato sottovuoto	5,7	0,92
17	branzino affettato affumicato sottovuoto	6,6	0,90
19	insalata di polpo	4,3	0,97
30	insalata di mare alla mediterranea	4,1	0,96
35	filetti sgombro grigliati	5,1	0,96
36	salmone affumicato	6	0,96
41	filetti sardine marinate	4	0,92
48	mare più	4	0,96
49	insalata di mare	3,4	0,96
50	frittura marinata	4,5	0,95
52	insalata di mare	4,5	0,96

6. CONCLUSIONI

In caso di alimenti che per caratteristiche intrinseche non sono favorevoli per lo sviluppo di *Listeria monocytogenes*, il nuovo regolamento CE 2073 del 2005 impone il ritiro del prodotto dal mercato solo se al suo interno vengono rilevate più di 100 UFC/g di questo patogeno. Questa nuova disposizione abbassa notevolmente il numero di prodotti alimentari che devono essere ritirati dal mercato diminuendo di conseguenza responsabilità e costi per il produttore. Prima di questo nuovo regolamento infatti venivano considerati a rischio e quindi ritirati dal mercato indiscriminatamente tutti i prodotti che risultavano anche soltanto positivi alla presenza qualitativa del patogeno anche se tali prodotti non costituiscono un rischio per la salute umana.

In questo lavoro una percentuale del 9% dei campioni è risultata positiva alla prova microbiologica qualitativa ed in particolare una percentuale pari al 5,3% in semiconserve che per caratteristiche di pH e a_w erano favorevoli alla crescita del patogeno. Si tratta comunque di valori inferiori alla dose minima infettante che come precedentemente riportato, deve superare 100 UFC/g. Probabilmente, in questi casi, un'analisi svolta prima dell'immissione in commercio avrebbe dato risultato negativo. Di fatto, per questi campioni risultati positivi alla sola prova qualitativa, se non pericolosi direttamente per il consumatore, una volta in cucina potrebbero essere causa di cross-contaminazioni. Il rispetto delle buone pratiche di lavorazione in cucina si dimostra fattore importante per questo tipo di alimenti ittici. Un campione è risultato positivo alla prova quantitativa, con valore di 220 UFC/g, quindi superiore alla dose infettante minima, pari a 100 UFC/g, e pertanto potenzialmente pericoloso. Questo conferma come sia importante mantenere un costante controllo di questa tipologia alimentare, in fase di produzione e di commercializzazione. In questo caso il basso valore di a_w , proibitivo per la moltiplicazione di *L. m.*, depone per una contaminazione del patogeno con livelli superiori a 100 UFC/g, già durante la fase di lavorazione.

Riguardo l'impiego del metodo biomolecolare, si è rilevata, anche se in bassa percentuale, la presenza di falsi negativi, in quanto campioni positivi alla prova microbiologica qualitativa sono risultati negativi alla prova con PCR RealTime. Il motivo di questi risultati potrebbe essere la presenza di inibenze nel

tipo di prodotto verso gli enzimi di reazione per la PCR e/o la sensibilità stessa del metodo. Viceversa, per i campioni risultati negativi alla prova microbiologica qualitativa e quantitativa e positivi in quella molecolare, è ragionevole pensare che il DNA rilevato dalla PCR appartenga ad un organismo morto. In questo caso l'informazione potrebbe essere utile al produttore riguardo lo stato di contaminazione in fase di preparazione. Anche se l'approccio di tipo molecolare è molto più rapido di quello microbiologico, il primo infatti può essere completato anche in poche ore mentre per il secondo la risposta definitiva sulla presenza del patogeno non si può avere in meno di sette giorni, appare prudente non sostituire la prova microbiologica classica con l'esame biomolecolare, almeno in caso di analisi di semiconserve ittiche.

Concludendo, i risultati di questo lavoro rafforzano il fatto che in semiconserve ittiche, i valori di pH e a_w all'interno del range di crescita di *L. m.* sono un fattore importante e le norme di autocontrollo sono decisamente fondamentali per limitarne la moltiplicazione. Essendo infatti *L. m.* un germe ubiquitario è impossibile arrivare ad una sua eradicazione (Gandhi and Chikindas, 2007) e dovrebbero essere invece i produttori a intervenire sulla loro attività produttiva applicando buone pratiche di lavorazione nonché il rispetto del flusso di processo unidirezionale (Boni *et al.*, 2006).

BIBLIOGRAFIA

- Annous, B.A., Becker, L.A., Bayles, D.O., Labeda, D.P., Wilkinson, B.J., 1997. Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 63 (10), 3887-3894.
- Arcangeli, G., 2006. Scheda regione Veneto (sito web).
- Arcangeli, G., Baldrati, G., Pirazzoli, P., 2003. La trasformazione dei prodotti della pesca: tecnologia, controllo e igiene di lavorazione. Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari, Parma, pp. 85-87.
- Aureli, P., 1998. Laboratory findings on *Listeria monocytogenes* strains involved in a large outbreak of febrile gastroenteritis occurred in schools served by a mass-catering system. In: XIII International Symposium on Problems of Listeriosis, Halifax, Abstract No. 47.
- Bayles, D.O., Annous, B.A., Wilkinson, B.J., 1996. Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 62 (3), 1116-1119.
- Bayles, D.O., Wilkinson, B.J., 2000. Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 30 (1), 23-27.
- Beales, N., 2004. Adaptation of microorganism to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. Comp. Rev. Food Sci. Food Safety 3 (1), 1-20.
- Boni, P., Vio, P., Pagliuca, G., Trevisani, M., Allegranzi, B., Dalla Ponza, M., Busani, L., Daminelli, P., Finazzi, G., Ravarotto, L., 2006. Metodi di tutela sanitaria delle produzioni alimentari di nicchia e di protezione della

popolazione umana dalle pandemie di origine animale. Società italiana di medicina veterinaria preventiva, pp. 57-79.

- Charpentier, E., Courvalin, P., 1999. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43, 2103-2108.
- Christian, J.H.B., 1980. Reduced water activity. In: Silliker, J.H. et al. (Ed.). Microbial Ecology of Foods. Factors Affecting Life and Death of Microorganisms, Vol. 1. Academic Press, New York, pp. 70-91.
- Cotter, P.D., Hill, C., 2003. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67 (3), 429-453 (table).
- Cotter, P.D., Gahan, C.G., Hill, C., 2000. Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes* F0F1-ATPase operon in the acid tolerance response. Int. J. Food Microbiol. 60 (2-3), 137-146.
- Cotter, P.D., Gahan, C.G., Hill, C., 2001. A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. Mol. Microbiol. 40 (2), 465-475.
- Dalgaard, P., 1997. Predictive microbiological modelling and seafood quality. In: Luten, J., Børresen, T., Oehlenschläger, J. (Eds.), Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality, Amsterdam: Elsevier, pp. 431-443.
- Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B., Proctor, M.E., Griffin, P.M., 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. New Engl. J. Med. 336, 100-105.

- De Castelli, L., Adriano, D., Gallina, S., Barbaro, A., Ferrari, A., Marinella, G., 2004. *Listeria monocytogenes* nelle preparazioni a base di pesce. Ind. Alim. 43 (6), 644-647.
- Duche, O., Tremoulet, F., Glaser, P., Labadie, J., 2002a. Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 68 (4), 1491-1498.
- Faith, N.G., Yousef, A.E., Luchansky, J.B., 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by liquid smoke and isoeugenol, a phenolic component found in smoke. J. Food Safety 12, 303-314.
- Frederiksen, B., Samuelsson, S., 1992. Foeto-maternal listeriosis in Denmark 1981-1988. J. Infect. 24, 277-287.
- Galli Volonterio, A., 2005. Microbiologia degli alimenti. Casa Editrice Ambrosiana, pag. 21.
- Gandhi, M., Chikindas, M.L., 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. International Journal of Food Microbiology 113, 1-15.
- Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, n. L 338 del 22 dicembre 2005. Regolamento (CE) n.2073/2005 della commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
- George, S.M., Lund, B.M., Brocklehurst, T.F., 1988. The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 6, 153-156.
- Hill, C., Cotter, P.D., Sleator, R.D., Gahan, C.G.M., 2002. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. Int. Dairy J. 12 (2-3), 273-283.

- Hitchins, A.D., 2003. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Bacteriological Analytical Manual Online, capitolo 10 (www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html).
- Huss, H.H., Jorgensen, L.V., Vogel, B.F., 2000. Control options for *Listeria monocytogenes* in sea foods. Int. J. of Food Microb. 62: 267-274.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1996. Micro-organisms in Foods 5: Microbiological Specifications of Food Pathogens. London, Blackie Academic and Professional, 514 pp.
- Jurado, R.L., Farley, M.M., Pereira, E., Harvey, R.C., Schuchat, A., Wenger, J.D., Stephens, D.S., 1993. Increased risk of meningitis and bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection. Clin. Infect. Dis. 17, 224-227.
- Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2000. *Listeria* in tropical fish and fishery products. International Journal of Food Microbiology 62, 177-181.
- Liu, S., Graham, J.E., Bigelow, L., Morse, P.D., Wilkinson, B.J., 2002. Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. Appl. Environ. Microbiol. 68 (4), 1697-1705.
- Lovett, J., Francis, D.W., Hunt, J.M., 1987. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. J. Food Prot. 50, 188-192.
- Membre, J.-M., Thurette, J., Catteau, M., 1997. Modelling the growth, survival and death of *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Microbiol. 82, 345-350.
- Niedziela, J.-C., Macrae, M., Ogden, I.D., Nesvadba, P., 1998. Control of *Listeria monocytogenes* in salmon; antimicrobial effect of salting, smoking and specific smoke compounds. Lebensm.-Wiss.u.-Technol. 31, 155-161.

- Nørrung, B., 2000. Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches. *International Journal of Microbiology* 62, 217-221.
- Notermans, S., Hoornstra, E., 2000. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in fish products: some general principles, mechanism of infection and the use of performance standards to control human exposure. *International Journal of Food Microbiology* 62, 223-229.
- Nuvoloni, R., Pedonese, F., D'Ascensi, C., Rindi, S., 2005. Metodi di valutazione del rischio nei prodotti ittici. *Annali Fac. Med. Vet.*, pp. 93-107.
- Phan-Thanh, L., Mahouin, F., 1999. A proteomic approach to study the acid response in *Listeria monocytogenes*. *Electrophoresis* 20 (11), 2214-2224.
- Phan-Thanh, L., Mahouin, F., Alige, S., 2000. Acid response of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 55 (1-3), 121-126.
- Pini, P.N., Gilbert, R.J., 1988. The occurrence in the UK of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 6, 317-326.
- Payne, K.D., Rico-Munoz, E., Davidson, P.M., 1989a. The antimicrobial activity of phenolic compounds against *Listeria monocytogenes* and their effectiveness in a model milk system. *J. Food Prot.* 52, 151-153.
- Payne, K.D., Rico-Munoz, E., Davidson, P.M., 1989b. The antimicrobial activity of phenolic compounds against *Listeria monocytogenes* and their effectiveness in a model milk system. *Environ. Microbiol.* 64, 1773-1779.
- Poysky, F.T., Paranjpye, R.N., Peterson, M.E., Pelroy, G.A., Guttman, A.E., Eklund, M.W., 1997. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on hot-smoked

salmon by the interaction of heat and smoke or liquid smoke. J. Food Prot. 60, 649-654.

- Rocourt, J., Cossart, P., 1997. *Listeria monocytogenes*. In: Doyle, M.P., Bucchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), Food Microbiology (ASM) press, Washington DC, pp. 337-352.
- Rocourt, J., Jacquet, C., Reilly, A., 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. International Journal of Food Microbiology 62, 197-209.
- Rørvik, L.M., 2000. *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. International Journal of Food Microbiology 62, 183-190.
- Ross, T., Dalgaard, P., Tienungoon, S., 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. International Journal of Food Microbiology 62, 231-245.
- Ryser, E.T., Marth, E.H., 1991. *Listeria*, Listeriosis and food Safety. Marcel Dekker, New York, 632 pp.
- Salamina, G., Donne, E.D., Niccolini, A., Poda, G., Cesaroni, D., Bucci, M., Fini, R., Maldini, M., Schuchat, A., Swaminathan, B., Bibb, W., Rocourt, J., Binkin, N., Salmaso, S., 1996. a foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. Epidemiol. Infect. 117, 429-436.
- Schlech III, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., Broome, C.V., 1983. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. New Engl. J. Med. 308, 203-206.
- Shabala, L., Budde, B., Ross, T., Siegmund, H., McMeekin, T., 2002. Response of *Listeria monocytogenes* to acid stress and glucose availability

monitored by measurements of intracellular pH and viable counts. Int. J. Food Microbiol. 75 (1-2), 89-97.

- Sikorski, Z.E., Kolakowska, A., Burt, J.R., 1990. Postharvest biochemical and microbial changes. In: Sikorski, Z.E. (Ed.), Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 55-75.
- Skogberg, K., Syrjanen, J., Jahkola, M., Renkonen, O.V., Paavonen, J., Ahonen, J., Kontiainen, S., Ruutu, P., Valtonen, V., 1992. Clinical presentation and outcome of listeriosis in patients with and without immunosuppressive therapy. Clin. Infect. Dis. 14, 815-821.
- Small, P.L.C., Waterman, S.R., 1998. Acid stress, anaerobiosis and *gadCB* lessons from *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. Trends Microbiol. 6 (6), 214-216.
- Sumner, J., Ross, T., Ababouch, L., 2004. Application of risk assessment in the fish industry. FAO Fisheries Technical Paper, 442.
- Tienungoon, S., 1998. Some aspects of the ecology of *Listeria monocytogenes* in Salmonid Aquaculture, Ph.D. Thesis. University of Tasmania, Hobart, Australia, 286 p.
- Van Schaik, W., Gahan, C.G., Hill, C., 1999. Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lactacin 3147. J. Food Prot. 62 (5), 536-539.
- Wemekamp-Kamphuis, H.H., Sleator, R.D., Wouters, J.A., Hill, C., Abee, T., 2004. Molecular and physiological analysis of the role of osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 70 (5), 2912-2918.

SITI WEB

- www.epicentro.iss.it
- www.bact.wisc.edu

APPENDICE

La tabella sottostante riporta il totale dei campioni analizzati suddivisi in cinque unità campionarie con i relativi esiti delle analisi microbiologiche e biomolecolari.
Il simbolo "X" rappresenta sia il genere *Listeria* sia *L. m.*, il simbolo "I" rappresenta la specie *L. innocua*.

N° CAMPIONE	TIPOLOGIA PRODOTTO	ESITO MICROBIOLOGIC O QUALITATIVO					ESITO BIOMOLECOLAR E PER LISTERIA SPP					ESITO BIOMOLECOLAR E PER L. MONOCYTOGEN ES					pH	a _w
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
1	salmone affumicato preaffettato	I		X													5,7	0.90
2	cozze condite marinate																3,5	0.98
3	salmone affumicato																5,8	0.95
4	insalata di mare																4,2	0.98
5	carpaccio di polpo																4,9	0.98
6	gamberetti			X		X											4,9	0.98
7	insalata di mare																3,9	0,96
8	insalata di mare																3,8	0,96

9	salmone affumicato																5,9	0,96
10	nature di pesce spada																5,4	0,97
11	nature di salmone	X					X					X					5,7	0,91
12	insalata di mare																3,7	0,96
13	insalata di mare																3,9	0,96
14	gamberetti grigi		X														6,1	0,95
15	insalata di mare						X				X					X	4,2	0,93
16	tonno affumicato affettato sottovuoto										X					X	5,7	0,92
17	branzino affumicato affettato sottovuoto									X	X				X	X	6,6	0,90
18	filetti marinati																3,9	0,94
19	insalata di polpo						X					X					4,3	0,97
20	calamaretti conditi																3,6	0,96
21	insalata di mare																3,8	0,96
22	insalata di polpo																4	0,95
23	filetti di sgombro																3,7	0,96

24	surimi marinato																	3,4	0.97
25	filetti di sgombro con pepe																	6	0.92
26	peperoni ripieni tonno																	4,4	0.91
27	seppioline grigliate																	4,7	0.97
28	gamberetti																	4,7	0.96
29	polpo alla mediterranea																	4,3	0.96
30	insalata di mare alla mediterranea						X						X					4,1	0.96
31	polpo																	4,6	0.98
32	insalata di mare																	3,8	1
33	filetti di alici marinate																	4	0.94
34	carpaccio di pesce spada																	4,3	0.96
35	filetti di sgombro grigliati				X						X					X		5,1	0.96
36	salmone affumicato																	6	0.96
37	carpaccio di salmone marinato																	4,4	0.96
38	carpaccio di polpo																	4,8	0.97

39	salmone affumicato																	6	0.96
40	sugo fresco al tonno																	4,6	0.97
41	filetti di sardine marinate								X									4	0.92
42	sugo fresco spada																	4,9	0.97
43	insalata di polpo																	4,4	0.98
44	bocconcini di sarda marinati																	3,9	0.94
45	anguilla marinata																	4,2	0.97
46	sugo fresco gamberetti e zucchine																	6,3	0.95
47	filetti di aringhe affumicate																	5,6	0.96
48	insalata di mare						X	X	X	X		X	X	X	X			4	0.96
49	insalata di mare								X									3,4	0.96
50	frittura marinata								X		X							4,5	0.95
51	sugo fresco verace																	4,9	0.99
52	insalata di mare						X											4,5	0.96
53	pesce spada affettato affumicato sottovuoto																	5,4	0.93

54	insalata di polpo																	3,7	0.97
55	filetti di pesce azzurro																	3,8	0.93
56	insalata di mare																	3,6	0.99