



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale in
Biotecnologie per l'Alimentazione

Valutazione del potenziale di crescita di
Listeria monocytogenes in prodotti della pesca
trasformati

Relatore

Prof. Leonardo Alberghini

Correlatori

Dott.ssa Michela Favretti

Dott.ssa Alessandra Pezzuto

Laureanda

Elena Gobbo

Matricola n. 1179582

ANNO ACCADEMICO 2018 - 2019

INDICE

RIASSUNTO

ABSTRACT

INTRODUZIONE.....	1
1. <i>Listeria monocytogenes</i>	3
1.1 Caratteristiche morfologiche e chimico-fisiche	3
1.2 Fattori di virulenza e patogenesi.....	5
1.3 Listeriosi.....	9
1.3.1 Epidemiologia.....	10
1.4 <i>Listeria monocytogenes</i> negli alimenti.....	12
2. QUADRO NORMATIVO.....	16
2.1 Aspetti legislativi.....	16
2.2 Challenge test.....	19
3. SCOPO DELLA TESI.....	23
4. MATERIALI E METODI	24
4.1 Descrizione dei campioni alimentari.....	24
4.2 Scelta dei ceppi di <i>Listeria monocytogenes</i>	25
4.2.1 Preparazione dell'inoculo	26
4.2.2 Tipizzazione sierologica di <i>L. monocytogenes</i>	29
4.3 Modalità di contaminazione sperimentale	32
4.4 Modalità di conservazione dei campioni	33
4.5 Piano di campionamento	34
4.6 Analisi molecolari e microbiologiche.....	37
4.6.1 Analisi qualitativa di <i>L. monocytogenes</i> mediante Real Time PCR (AFNOR BRD 07/10 – 04/05).....	37
4.6.2 Analisi quantitativa colturale di <i>L. monocytogenes</i> (ISO 11290-2:2017)	40

4.6.3 Analisi quantitativa dei microrganismi mesofili a 30°C (ISO 4833-1:2013).....	43
4.6.4 Analisi quantitativa dei batteri lattici a 30°C (Metodo interno IZSVe).....	44
4.7 Analisi chimico-fisiche	46
5. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	47
5.1 Insalata di mare e legumi.....	47
5.2 Carpaccio di seppia	56
5.3 Salmone in insalata con olive verdi.....	60
6. CONCLUSIONI.....	65
BIBLIOGRAFIA.....	67
SITOGRAFIA	73
RINGRAZIAMENTI.....	Errore. Il segnalibro non è definito.

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1: Vie di infezione di <i>L. monocytogenes</i> (Vazquez-Boland et al., 2001).....	5
Figura 2: Meccanismo d'azione di <i>L. monocytogenes</i> (Pamer, 2004).....	6
Figura 3: Casi di zoonosi nel 2017 (report EFSA, 2018).	11
Figura 4: Trend dei casi di listeriosi umana registrati tra il 2008 e il 2017 (report EFSA, 2018). ...	12
Figura 5: Trasmissione di <i>L. monocytogenes</i> all'uomo tramite il consumo di frutta e verdura	14
Figura 6: Insalata di mare e legumi FIORITAL S.p.a.	24
Figura 7: Carpaccio di seppia FIORITAL S.p.a.	25
Figura 8: Salmone in insalata con olive verdi.....	25
Figura 9: <i>L. monocytogenes</i> in terreno ALOA.....	27
Figura 10: <i>L. monocytogenes</i> in terreno TSAYE.....	27
Figura 11: Preparazione delle brodoculture di <i>L. monocytogenes</i> in BHI (EURL Lm, 2014).	28
Figura 12: Agglutinazione dell'antigene H.....	32
Figura 13: <i>L. monocytogenes</i> quantitativa in terreno ALOA.....	42
Figura 14: Microrganismi mesofili su terreno PCA.	44
Figura 15: Batteri lattici su terreno MRSbl.....	46

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1: Criteri di sicurezza alimentare per <i>L. monocytogenes</i> (Reg. CE 2073/2005).	18
Tabella 2: Procedura per l'agglutinazione dell'antigene flagellare H.	30
Tabella 3: Procedura per l'agglutinazione dell'antigene somatico O.	31
Tabella 4: Piano di campionamento per il lotto 1-insalata di mare e legumi.	35
Tabella 5: Piano di campionamento per il lotto 2 e 3-insalata di mare e legumi.	36
Tabella 6: Piano di campionamento per il lotto 1-salmone in insalata con olive verdi.	36
Tabella 7: Fasi per la ricerca di <i>L. monocytogenes</i> mediante Real Time PCR.	38
Tabella 8: Fasi per la conta di <i>L. monocytogenes</i> a 37°C.	41
Tabella 9: Fasi per la conta dei microrganismi mesofili a 30°C.	43
Tabella 10: Fasi per la conta dei batteri lattici a 30°C.	45
Tabella 11: Campioni non contaminati artificialmente, lotto 1-insalata di mare e legumi.	47
Tabella 12: Campioni non contaminati artificialmente, lotto 2-insalata di mare e legumi.	47
Tabella 13: Campioni non contaminati artificialmente, lotto 3-insalata di mare e legumi.	48
Tabella 14: Campioni inoculati, lotto 1-insalata di mare e legumi.	49
Tabella 15: Campioni inoculati, lotto 2-insalata di mare e legumi.	49
Tabella 16: Campioni inoculati, lotto 3-insalata di mare e legumi.	50
Tabella 17: Dinamica di crescita di <i>L. monocytogenes</i> nelle brodocolture, lotto 1-insalata di mare e legumi.	51
Tabella 18: Dinamica di crescita di <i>L. monocytogenes</i> nelle brodocolture, lotto 2-insalata di mare e legumi.	51
Tabella 19: Dinamica di crescita di <i>L. monocytogenes</i> nelle brodocolture, lotto 3-insalata di mare e legumi.	52
Tabella 20: Potenziale di crescita relativo al lotto 1-insalata di mare e legumi. In grassetto sono evidenziate le mediane; LM = <i>L. monocytogenes</i> .	53
Tabella 21: Potenziale di crescita relativo al lotto 2-insalata di mare e legumi. In grassetto sono evidenziate le mediane; LM = <i>L. monocytogenes</i> .	54
Tabella 22: Potenziale di crescita relativo al lotto 3-insalata di mare e legumi. In grassetto sono evidenziate le mediane; LM = <i>L. monocytogenes</i> .	55
Tabella 23: Calcolo della deviazione standard nei tre lotti dell'insalata di mare e legumi (LM = <i>L. monocytogenes</i>).	56
Tabella 24: Campioni non contaminati artificialmente, lotto 1-carpaccio di seppia.	57

Tabella 25: Campioni inoculati lotto 1-carpaccio di seppia.....	58
Tabella 26: Dinamica di crescita di <i>L. monocytogenes</i> nelle brodocolture, lotto 1-carpaccio di seppia.	58
Tabella 27: Potenziale di crescita relativo al lotto 1-carpaccio di seppia. In grassetto sono evidenziate le mediane; LM = <i>L. monocytogenes</i>	59
Tabella 28: Calcolo della deviazione standard, lotto 1-carpaccio di seppia (LM = <i>L. monocytogenes</i>)......	60
Tabella 29: Campioni non contaminati artificialmente, lotto 1-salmone in insalata con olive verdi.	61
Tabella 30: Campioni inoculati lotto 1-salmone in insalata con olive verdi.....	61
Tabella 31: Dinamica di crescita di <i>L. monocytogenes</i> nelle brodocolture, lotto 1-salmone in insalata con olive verdi.	62
Tabella 32: Potenziale di crescita relativo al lotto 1-salmone in insalata con olive verdi. In grassetto sono evidenziate le mediane; LM = <i>L. monocytogenes</i>	63
Tabella 33: Calcolo della deviazione standard, lotto 1- salmone in insalata con olive verdi (LM = <i>L. monocytogenes</i>)......	63

RIASSUNTO

I challenge test sono delle prove microbiologiche di laboratorio, con le quali studiare il comportamento di *Listeria monocytogenes* in matrici alimentari considerate a rischio per la trasmissione del patogeno. Rappresentano una strategia efficace con cui l'operatore del settore alimentare può dimostrare che l'alimento, oggetto di studio, non favorisce la crescita del microrganismo durante l'intero periodo di monitoraggio.

In questa tesi sono state analizzate tre diverse matrici alimentari RTE (ready-to-eat): un'insalata di mare e legumi, un carpaccio di seppia e un salmone in insalata con olive verdi, contaminati artificialmente con una miscela di due ceppi di *Listeria monocytogenes*.

Oltre alla dinamica di comportamento del patogeno, sono state valutate anche la crescita della microflora associata all'alimento e le caratteristiche chimico-fisiche dello stesso, quali pH e a_w .

I prodotti alimentari sono stati conservati alle temperature ragionevolmente prevedibili di distribuzione, trasporto e stoccaggio e analizzati in specifici intervalli durante l'intera shelf-life.

Al termine del periodo di campionamento è stato valutato il potenziale di crescita (δ) del patogeno, definito come la differenza tra il \log_{10} della concentrazione del microrganismo espressa in UFC/g alla fine della prova e il \log_{10} della concentrazione espressa in UFC/g all'inizio della prova.

Per due dei prodotti alimentari analizzati, l'insalata di mare e legumi e il carpaccio di seppia, è stato osservato un valore di δ minore/uguale di $0,5 \log_{10}$ UFC/g, dimostrando la mancata capacità dell'alimento di supportare la crescita di *Listeria monocytogenes* e potendo dunque applicare il limite di 100 UFC/g previsto dal Reg. CE 2073/2005. Invece per il salmone in insalata con olive verdi il potenziale di crescita δ è risultato essere maggiore di $0,5 \log_{10}$ UFC/g: ciò significa che il prodotto ha favorito la crescita del microrganismo e di conseguenza il limite di tolleranza di 100 UFC/g non può essere applicato.

Parole chiave: *Listeria monocytogenes*; challenge test; prodotti ittici.

ABSTRACT

Challenge tests are microbiological laboratory-based studies that are used to evaluate the behaviour of *Listeria monocytogenes* in high-risk foods, which are responsible for the transmission of the pathogen. They are efficient strategies through which the food business operator (FBO) can prove that the product does not support the growth of the pathogen during the monitoring period.

In this study, we analysed three different RTE (ready-to-eat) foods: a seafood salad with legumes, a cuttlefish carpaccio and a salmon salad with green olives, artificially contaminated by two *Listeria monocytogenes* strains.

In addition to the behaviour dynamics of the pathogen, we evaluated the growth of the associated microflora and the physico-chemical characteristics, like pH and a_w .

The products were stored under foreseeable conditions of transportation, storage at retail and at consumer level and analysed at specific moments during the shelf-life.

Then we evaluated the growth potential (δ) of *Listeria monocytogenes*, defined as the difference between the \log_{10} CFU/g at the end of the test and the \log_{10} CFU/g at the beginning of the test.

For the seafood salad with legumes and the cuttlefish carpaccio we observed that δ was $\leq 0,5 \log_{10}$ CFU/g, showing the inability to support the growth of *Listeria monocytogenes*. According to the Regulation EC 2073/2005, the limit for the FBO is 100 CFU/g in both the food matrices.

For the salmon salad with green olives we observed that δ was $> 0,5 \log_{10}$ CFU/g: this means that the product was able to support the growth of *Listeria monocytogenes* and the tolerance limit of 100 CFU/g cannot be applied.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; challenge test; fishery products.

INTRODUZIONE

Nel corso degli ultimi anni sono stati introdotti diversi Regolamenti europei in materia di sicurezza alimentare, con lo scopo di garantire l'immissione sul mercato di alimenti non pericolosi per la salute pubblica. La scoperta di nuovi microrganismi patogeni trasmissibili con gli alimenti, le non corrette prassi igieniche aziendali e il mancato rispetto delle modalità di conservazione ed uso dei prodotti da parte dei consumatori, possono rappresentare delle possibili cause di tossinfezioni provocate da alimenti contaminati.

Uno dei principali batteri patogeni, responsabile di recenti focolai in Europa, è *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), agente eziologico della listeriosi. Tale malattia, seppur rara, costituisce un grave problema per la sanità pubblica, in quanto presenta un tasso di mortalità che oscilla tra il 20 e il 30% (Lomonaco *et al.*, 2015; Abdollahzadeh *et al.*, 2016).

L'elevata capacità di *L. monocytogenes* nel provocare infezioni nell'uomo è da ricondurre non solo alla sua virulenza, ma anche all'abilità di resistere a condizioni ambientali estreme, che le consentono di persistere nelle aziende alimentari e di contaminare un'enorme varietà di prodotti alimentari.

Gli alimenti considerati più a rischio sono i ready-to-eat (RTE), cioè prodotti pronti al consumo, che non necessitano di alcun trattamento termico o di altro tipo prima di essere consumati. Tra questi spiccano i prodotti della pesca, che assieme al pesce, rappresentano la categoria di alimenti risultati positivi per *L. monocytogenes* con più frequenza nell'anno 2017, secondo quanto riportato nell'ultimo report EFSA.

Dato l'aumento della richiesta di prodotti RTE sul mercato, è stato necessario introdurre una normativa europea, volta a tutelare la salute dei consumatori e a stabilire dei limiti di tolleranza da adottare per la corretta commercializzazione dei prodotti a rischio.

Il Regolamento CE 2073/2005 definisce i parametri relativi a *L. monocytogenes*, che l'operatore del settore alimentare (OSA) deve rispettare nei prodotti RTE, con lo scopo di evitare casi di listeriosi umana dovuti al consumo di alimenti contaminati.

La normativa vigente suggerisce di valutare la dinamica di comportamento di *L. monocytogenes* tramite la progettazione di prove di laboratorio, conosciute come challenge test. Essi consentono di studiare se il prodotto alimentare e le relative modalità di conservazione possano favorire la crescita del microrganismo, durante le fasi di distribuzione, trasporto e stoccaggio.

Ciò viene valutato tramite il calcolo del potenziale di crescita (δ), fondamentale per stabilire se lo sviluppo del microrganismo in questione supera i limiti di tolleranza imposti dal Reg. CE 2073/2005.

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di valutare il potenziale di crescita di *L. monocytogenes* in tre prodotti della pesca trasformati, un'insalata di mare e legumi, un carpaccio di seppia e un salmone in insalata con olive verdi. L'esecuzione del challenge test è stata realizzata seguendo le linee guida europee, sviluppate dal Laboratorio Comunitario di Riferimento per *Listeria monocytogenes*.

1. *Listeria monocytogenes*

1.1 Caratteristiche morfologiche e chimico-fisiche

Listeria monocytogenes è un patogeno intracellulare, agente eziologico della listeriosi, malattia trasmessa dagli alimenti.

Il genere *Listeria* comprende dieci specie, tra le quali *L. monocytogenes* è l'unica ad essere patogena per l'uomo e per gli animali, mentre *L. ivanovii* lo è solo per gli animali.

L. monocytogenes è un batterio ubiquitario, naturalmente presente nel suolo, nell'acqua e negli alimenti (Liu, 2006). La sua trasmissione all'uomo avviene principalmente per l'ingestione di alimenti contaminati. Tra i principali prodotti a rischio si classificano gli RTE (ready-to-eat), alimenti pronti al consumo, che non necessitano di cottura o altro trattamento prima di essere consumati.

La prima comparsa del microrganismo si ebbe nel 1926, quando un batterio Gram positivo (*Bacterium monocytogenes*) causò la morte di un gruppo di conigli per monocitosi. Successivamente venne descritto un caso di moria di roditori in Sud Africa, colpiti da "Tiger River Disease", il cui agente eziologico era sempre un batterio Gram positivo. Tale malattia aveva provocato negli animali un'infezione epatica necrotizzante e il microrganismo venne chiamato *Listerella hepatolytica*, in onore del chirurgo britannico Joseph Lister. Alcuni studi consentirono di capire che i due microrganismi erano, in realtà, lo stesso batterio, che venne così chiamato *L. monocytogenes* (Pamer, 2004).

Classificato come patogeno emergente, *L. monocytogenes* è un batterio Gram positivo, aerobio e anaerobio facoltativo, asporigeno, psicrotrofo, catalasi positivo, indolo e ossidasi negativo, β -emolitico, mobile per la presenza di flagelli peritrichi, ma solo a 25-30°C (Lemon *et al.*, 2007); al microscopio presenta una forma a bastoncino (dimensioni 0,5 x 1-1,5 μ m).

Per le sue caratteristiche fisiologiche, *L. monocytogenes* risulta essere particolarmente resistente a condizioni estreme di temperatura, salinità e pH: riesce a sopravvivere e a replicare alle temperature di refrigerazione. Cresce tra -1,5°C e 45 °C (optimum tra 30 e 37 °C), a valori di pH compresi tra 4,2 e 9,5 e a valori di a_w a partire da 0,90 (EURL *Lm*, 2014).

È alotollerante, sopporta infatti condizioni di salinità dell'8-10%. È tra i microrganismi più termoresistenti, ma la cottura degli alimenti al di sopra dei 65°C è sufficiente per inattivarlo (<https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/listeria>).

Alcuni studi hanno dimostrato che alti livelli di CO₂ (> 80%) riducono la sua crescita (Huss *et al.*, 2000); questo dato è utile per poter decidere che tipo di atmosfera ricreare negli alimenti da confezionare, in modo che sia inibito lo sviluppo del patogeno.

L. monocytogenes resiste nell'ambiente grazie alla formazione di biofilm: è in grado di sopravvivere sulle aree di lavorazione e sulle attrezzature delle aziende alimentari, rendendo i processi di sanificazione particolarmente difficili e aumentando il rischio di cross-contaminazioni (Borucki *et al.*, 2003).

Grazie allo studio degli antigeni somatici O e flagellari H, sono stati identificati 13 sierotipi riconducibili a *L. monocytogenes*. Essi sono: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7. I sierotipi coinvolti nella maggior parte dei casi di listeriosi sono 1/2a, 1/2b e 4b; quest'ultimo è associato più frequentemente ai casi di listeriosi umana (Liu, 2006).

Doumith *et al.* (2004) hanno sviluppato una multiplex PCR per suddividere i sierotipi più frequentemente isolati in alimenti e pazienti in quattro gruppi differenti. Al sierogruppo 1 appartengono i sierotipi 1/2a e 3a; 1/2c e 3c fanno parte del gruppo 2; il sierogruppo 3 comprende 1/2b, 3b e 7, mentre al quarto gruppo appartengono i sierotipi 4b, 4d e 4e.

Successivi studi di tipizzazione sierologica e molecolare hanno consentito di classificare i sierotipi di *L. monocytogenes* in quattro lineages o linee genetiche (Lomonaco *et al.*, 2015).

Al lineage I appartengono i sierotipi 4b, 1/2b, 3b, 4d e 4e, mentre all'interno del lineage II vengono collocati 1/2a, 1/2c, 3a e 3c. I sierotipi 4a, 4c e alcuni ceppi con sierotipo 4b fanno parte del lineage III; recenti studi hanno inoltre consentito di classificare alcuni ceppi con sierotipo 4a, appartenenti al gruppo III, nel nuovo lineage IV (Rawool *et al.*, 2016). I sierotipi appartenenti ai quattro lineages presentano caratteristiche fenotipiche diverse, come la resistenza alle batteriocine e a condizioni ambientali estreme; differiscono anche per l'ecologia e per caratteristiche genetiche, che li rendono capaci di provocare infezioni più o meno intense (Orsi *et al.*, 2011).

I ceppi del lineage I sono stati isolati da casi di listeriosi umana, mentre quelli facenti parte del lineage II sono di provenienza alimentare e ambientale. Il lineage III e IV sono meno frequenti e isolati da animali.

È noto che la virulenza e la capacità di invadere le cellule dell'ospite variano tra i ceppi di *L. monocytogenes*: ciò rende quindi necessaria la tipizzazione per prevedere i rischi associati alla salute umana (Su *et al.*, 2019).

1.2 Fattori di virulenza e patogenesi

Il consumo di alimenti contaminati da *L. monocytogenes* è la via principale con cui l'uomo entra in contatto con il microrganismo.

Il patogeno, una volta raggiunto il tratto intestinale, è in grado di invadere gli enterociti e le cellule M, localizzate nelle placche di Peyer, da cui poi riesce a migrare nel fegato e nella milza.

Superate le difese immunitarie di questi organi, *L. monocytogenes* può sfruttare il torrente circolatorio per colonizzare altri distretti corporei: riesce ad attraversare la barriera ematoencefalica e invadere il sistema nervoso centrale ed arrecare danno al feto, oltrepassando la placenta (Figura 1).

Nel torrente circolatorio, il patogeno può servirsi dei monociti per colonizzare e infettare altri organi. I monociti non favoriscono lo sviluppo di *L. monocytogenes*, ma, se infettati, vengono utilizzati come veicolo, consentendo così l'invasione del sistema nervoso centrale (Jones and D'Orazio, 2017).

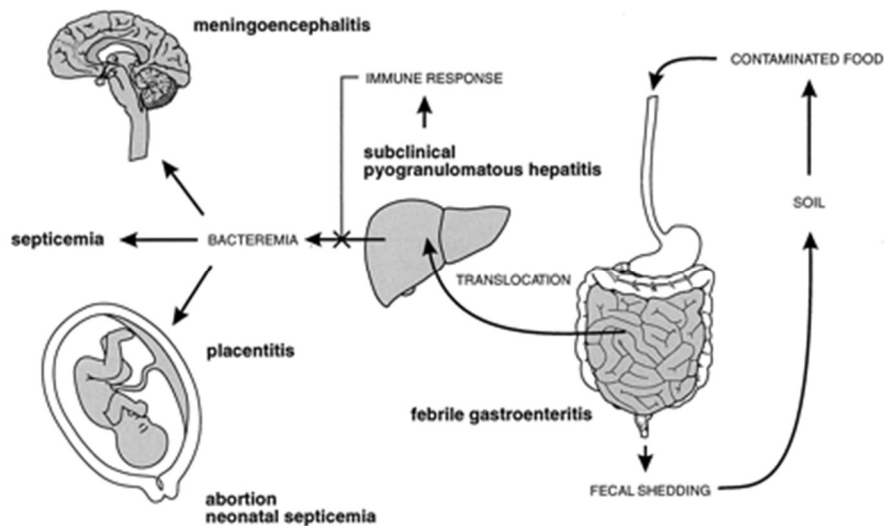


Figura 1: Vie di infezione di *L. monocytogenes* (Vazquez-Boland et al., 2001).

L'elevata invasività e la capacità di infettare diversi tipi cellulari, tra cui cellule non fagocitarie come cellule endoteliali, enterociti e fibroblasti, sono dovute alla presenza di due proteine, note come internalina A (InlA) e B (InlB). InlA interagisce con la glicoproteina E-caderina, localizzata sulle cellule epiteliali bersaglio, mentre l'internalina B interagisce con il recettore Met, situato sulla superficie del fattore di crescita degli epatociti (Drevets and Bronze, 2008).

L. monocytogenes presenta differenze di specie per quanto riguarda l'efficienza con cui infetta le cellule epiteliali; ad esempio, è stato dimostrato che la maggior resistenza dei topi alle infezioni, è

dovuta ad una mutazione di un singolo amminoacido nella E-caderina, rispetto alla proteina umana (Pamer, 2004).

Diversi studi condotti per approfondire l'invasività di *L. monocytogenes* hanno evidenziato l'enorme importanza che le internaline InlA e InlB assumono durante il processo di invasione cellulare. Su *et al.* (2019) hanno dimostrato che mutazioni a livello del gene *inlA* portano alla formazione di InlA tronca, la quale, *in vitro*, diminuisce la capacità di invadere le cellule intestinali umane Caco-2. La mutazione responsabile della diminuzione dell'invasività è la formazione di un codone di stop prematuro, che porta all'attenuazione della virulenza del microrganismo. Di conseguenza questo tipo di mutazione può essere utilizzato come marcatore molecolare per prevedere i rischi associati al consumo di alimenti.

Grazie all'attività di questi fattori di virulenza, il microrganismo viene internalizzato nel vacuolo delle cellule bersaglio oppure viene fagocitato direttamente dai macrofagi e neutrofili.

Riesce poi a lisare le pareti del vacuolo o fagosoma, sfruttando l'attività di altri fattori di virulenza: la listeriolisina O e due fosfolipasi (PC-PLC e PI-PLC). Una volta rilasciata nel citoplasma, *L. monocytogenes* replica e invade le cellule adiacenti, mediante l'azione della proteina ActA (Figura 2). Quest'ultima polimerizza l'actina, spingendo il batterio da una cellula all'altra, assumendo un tipico aspetto 'a coda di cometa' (Coelho *et al.*, 2019).

Sfruttando tale meccanismo, il microrganismo non entra in contatto con i liquidi extracellulari, rendendosi così invisibile alle cellule del sistema immunitario.

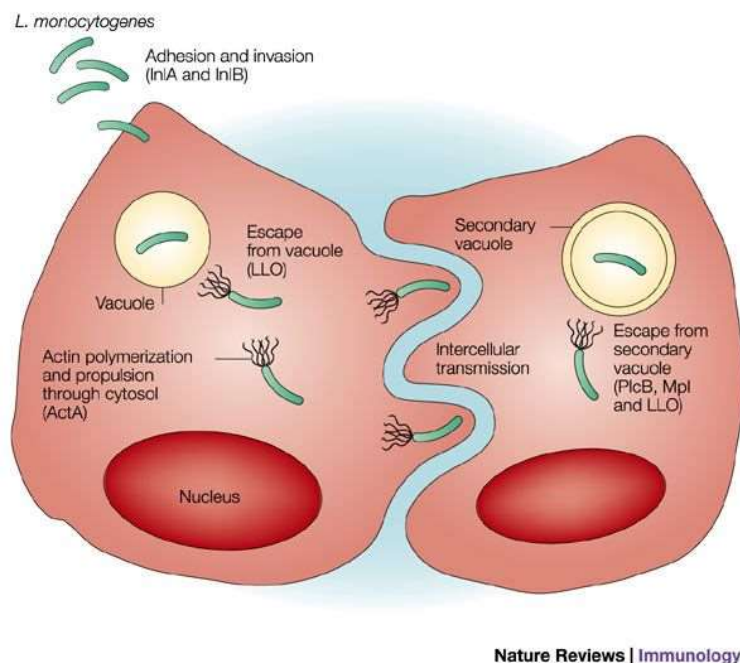


Figura 2: Meccanismo d'azione di *L. monocytogenes* (Pamer, 2004).

Secondo Coelho *et al.* (2019) *L. monocytogenes*, come altri batteri Gram positivi, produce delle vescicole extracellulari, all'interno delle quali vengono trasportate numerose proteine tossiche, tra cui la listerolisina e le fosfolipasi. Tali vescicole sono altamente dannose per le cellule dei mammiferi: la listeriolisina, rilasciata dalle vescicole, può interagire con i componenti del reticolo endoplasmatico e dei mitocondri della cellula bersaglio e causare delle perturbazioni della membrana di questi organelli. Tali perturbazioni innescano una cascata di segnali, che inducono la cellula all'autofagia. Alcuni studi hanno dimostrato che la capacità di *L. monocytogenes* di adattarsi ad ambienti diversi, come i prodotti alimentari e il tratto gastrointestinale di animali e uomo, sia in parte dovuta a geni che si trovano sotto il controllo del fattore Sigma B (Gahan and Hill, 2014; Abram *et al.*, 2008). Quest'ultimo regola la trascrizione dei geni che codificano per la risposta allo stress e svolge un ruolo chiave nel determinare la virulenza del microrganismo, controllando l'espressione di PrfA, regolatore trascrizionale per diversi geni della virulenza (Ollinger *et al.*, 2009).

Mutanti di *L. monocytogenes* per il fattore Sigma B presentano una ridotta capacità di invadere le cellule epiteliali, a causa della conseguente ridotta espressione delle internaline (Abram *et al.*, 2008). Per colonizzare l'apparato intestinale dell'uomo, *L. monocytogenes* deve attraversare l'ambiente gastrico, che presenta un valore di pH molto basso. Per resistere a tale acidità, il microrganismo ha sviluppato strategie diverse. Una di esse è rappresentata dal sistema GAD (decarbossilasi dell'acido glutammico). Tale sistema prevede la conversione dell'acido glutammico extracellulare in GABA (acido γ -amminobutirrico), mediante il consumo di protoni interni alla cellula batterica. Il GABA prodotto viene poi rilasciato all'esterno da una pompa antiporto, che a sua volta consente l'introduzione di un'altra molecola di acido glutammico. Si innesca così un ciclo, che porta al consumo di protoni, aumentando il pH interno alla cellula batterica e contemporaneamente l'ambiente esterno viene alcalinizzato, in quanto il GABA risulta meno acido dell'acido glutammico. In questo modo, *L. monocytogenes* riesce a superare la barriera gastrica e giungere nell'intestino dell'organismo bersaglio.

Nell'intestino, il microrganismo entra in contatto con gli acidi biliari, contenuti nella bile e fondamentali per la digestione dei lipidi. Essi svolgono attività battericida: alterano la struttura della membrana batterica, causando la dissociazione delle proteine che la compongono; provocano danni al DNA e inducono stress ossidativo nella cellula batterica (Gahan and Hill, 2014).

L. monocytogenes presenta un enzima, noto come BSH (Bile Salt Hydrolase), attraverso il quale riesce a bypassare l'attività degli acidi biliari.

L'espressione di BSH è regolata dal fattore Sigma B e la sua attività consiste nell'idrolizzare gli acidi biliari coniugati, impedendo quindi la loro azione. In questo modo, il microrganismo è libero di colonizzare l'intestino e provocare infezione.

L'adattamento di *L. monocytogenes* negli alimenti a diverse condizioni di acidità e salinità può consentire quindi un miglioramento delle strategie di sopravvivenza a livello del tratto gastrointestinale. Per questo motivo, viene definito “evolving pathogen” per la sua capacità di modificare le caratteristiche fenotipiche e genotipiche, in base alle condizioni di stress esterne, come la presenza nei prodotti alimentari di sostanze acide, nuovi additivi e innovative tecnologie alimentari (Gambarin *et al.*, 2012).

Nell'organismo bersaglio, *L. monocytogenes* viene attaccata dal sistema immunitario, in particolare dall'immunità innata e adattativa, nella sua componente cellulo-mediata.

Quando il sistema immunitario rileva la presenza del microrganismo, si ha l'attivazione delle cellule NK (Natural Killer) e dei macrofagi, responsabili della produzione di diverse citochine, tra cui l'interferone γ (IFN- γ) e il fattore di necrosi tumorale TNF, fondamentali per contrastare l'infezione. Nonostante venga indotta la produzione di IFN- γ , Clark *et al.* (2016) hanno dimostrato che l'attivazione delle cellule NK porta ad un aumento della suscettibilità nei confronti di *L. monocytogenes*, dovuta alla secrezione della citochina anti-infiammatoria IL-10.

La proteina batterica p60 di *L. monocytogenes* induce le cellule NK a produrre IL-10, limitando la produzione di IFN- γ ; ciò si verifica sia a livello murino sia a livello umano (Clark *et al.*, 2016).

La citochina IL-10 dunque sopprime sia l'immunità innata sia quella adattativa, rendendo l'organismo bersaglio più suscettibile alle infezioni da *L. monocytogenes*.

Non è ancora del tutto chiaro se siano effettivamente le cellule NK ad essere la principale fonte di IL-10; nonostante ciò, i dati dimostrano l'elevata abilità del microrganismo nel neutralizzare i principali sistemi di difesa dell'ospite.

Clark *et al.* (2016) ipotizzano infine che il fisiologico aumento nel numero di cellule NK con l'età e in stato di gravidanza, possano essere una delle motivazioni per cui tali categorie di persone siano particolarmente suscettibili alle infezioni da *L. monocytogenes*.

Neutrofili, macrofagi e cellule NK rappresentano una prima linea di difesa durante gli stadi iniziali dell'infezione, mentre i linfociti T sono i principali componenti dell'immunità adattativa coinvolti nelle infezioni da *L. monocytogenes* e svolgono un ruolo protettivo in caso di successive infezioni.

I linfociti T, come le altre cellule del sistema immunitario innato, producono interferone γ , ma si ritiene che la protezione nei confronti del microrganismo sia dovuta anche alla produzione di altri mediatori, come TNF e la granulisina (Pope *et al.*, 2001).

1.3 Listeriosi

La listeriosi risulta essere un problema sanitario particolarmente importante, non tanto per la frequenza con cui si manifesta, essendo una malattia piuttosto rara, quanto per l'elevato tasso di mortalità e di ospedalizzazione (rispettivamente 13,8% e 98,6% nel 2017 secondo il report EFSA).

La malattia è soprattutto pericolosa per alcune categorie di persone, nelle quali l'ingestione di una bassa carica microbica può portare a danni gravi, fino alla morte.

Le persone a rischio sono individuabili in neonati, anziani sopra i 64 anni, donne in gravidanza e persone immunocompromesse, come malati di AIDS.

Per causare la malattia, generalmente la dose infettante minima deve essere di circa 10^6 UFC (Unità Formanti Colonie) per grammo di alimento; mentre per le categorie a rischio, si aggira intorno a 10^2 - 10^4 UFC/g. Ovviamente questi dati sono relativi: è noto infatti che la dose infettante può variare a seconda della virulenza e patogenicità del ceppo, ma anche dalle condizioni di salute dell'ospite (Buchanan *et al.*, 2017).

La listeriosi può manifestarsi in una forma invasiva e in una non invasiva.

La forma non invasiva è tipica delle persone che godono di buona salute e consiste in una gastroenterite febbrile, tipica delle tossinfezioni alimentari. Il periodo di incubazione varia da 6 ore a 10 giorni (Goulet *et al.*, 2013) e i sintomi che compaiono sono diarrea, febbre, dolori addominali, brividi e cefalea (Drevets and Bronze, 2008).

La listeriosi invasiva è molto più grave: si presenta quando il microrganismo, tramite il torrente circolatorio, passa dall'apparato intestinale in altri distretti corporei, giungendo fino al sistema nervoso centrale. Si manifesta con setticemia, spesso in aggiunta ad alterazioni del sistema nervoso, quali meningiti, meningoencefaliti, romboencefaliti e ascessi cerebrali. In questi casi, i sintomi si possono presentare dopo circa 3 settimane, fino ad un massimo di 70 giorni, dall'ingestione dell'alimento contaminato (<https://www.epicentro.iss.it/listeria/>).

Esiste anche una terza forma di listeriosi, che colpisce specificatamente le donne in gravidanza. Essa provoca sintomi simil-influenzali, come febbre e brividi, ma può portare, nei casi più gravi, ad aborto spontaneo, morte in utero, nascita prematura e infezioni neonatali. Queste manifestazioni sono dovute alla trasmissione del batterio per via transplacentare o per contatto con il canale vaginale colonizzato (Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007).

La listeriosi neonatale può inoltre presentarsi con esordio precoce oppure tardivo. Nel primo caso, si possono osservare casi di polmonite, batteriemia e meningite ed è associata alla trasmissione di *L. monocytogenes* dalla madre infetta al neonato, nel momento del parto. In alcuni casi, si può sviluppare granulomatosi infantile, con formazione di granulomi e ascessi in fegato, milza e polmoni.

La forma ad esordio tardivo è tipica dei neonati a termine, senza complicanze durante la gravidanza e si manifesta con meningiti.

La listeriosi può essere diagnosticata tramite emocolture, analisi del liquido cerebrospinale e tamponi vaginali. Il trattamento dell'infezione da *L. monocytogenes* prevede la somministrazione di antibiotici.

Recenti studi hanno dimostrato l'importanza del ruolo del microbiota intestinale nella difesa contro le infezioni da parte di batteri patogeni. Ciò è dovuto alla capacità dei batteri commensali di produrre sostanze tossiche, come le batteriocine, che agiscono inibendo la crescita dei patogeni, ma è dovuto anche alla competizione per i nutrienti.

Studi su modelli murini hanno rivelato che una flora microbica intestinale danneggiata può favorire le infezioni da *L. monocytogenes*, rendendo più facile il suo passaggio attraverso la mucosa intestinale (Becattini *et al.*, 2017).

Questo potrebbe spiegare l'elevata suscettibilità dei pazienti immunocompromessi alle infezioni da *L. monocytogenes*: la somministrazione prolungata di antibiotici e farmaci è responsabile dell'alterazione del microbiota intestinale, il cui danno può ridurre le difese immunitarie e lo strato mucosale protettivo a livello intestinale. Tale scenario può favorire la crescita e l'azione tossica di *L. monocytogenes*. Questa spiegazione può anche essere estesa ad altri soggetti a rischio, come neonati e donne in gravidanza, spesso interessati da disbiosi intestinale.

Becattini *et al.* (2017) affermano inoltre che le specie commensali attive nel garantire la protezione da *L. monocytogenes* appartengono all'ordine dei Clostridiales, ma anche diversi Lattobacilli sono noti per produrre batteriocine ad attività listericida. Questi dunque potrebbero essere usati come probiotici per limitare i danni causati da *L. monocytogenes*.

1.3.1 Epidemiologia

Dall'ultimo report EFSA (European Food Safety Authority), pubblicato nel novembre 2018 e riguardante le tossinfezioni alimentari verificatesi nel 2017, si evince come la listeriosi si mantenga in quinta posizione come numero di casi all'anno, dopo la campilobatteriosi, la salmonellosi, le infezioni da *Yersinia* e da *Escherichia coli* produttori di Shiga-Tossina (STEC).

Nel 2017 si sono verificati un totale di 2.480 casi confermati di listeriosi umana invasiva, registrando un aumento rispetto agli anni precedenti (Figura 3).

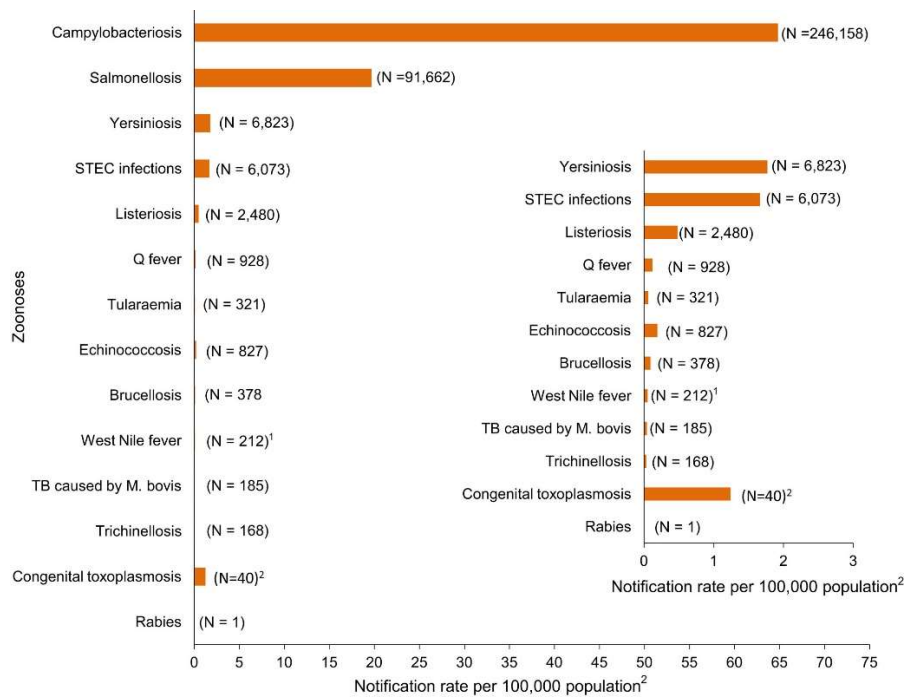


Figura 3: Casi di zoonosi nel 2017 (report EFSA, 2018).

Sulla base dei dati relativi al 2017, la listeriosi rimane la zoonosi più severa con il più alto tasso di ospedalizzazione (98,6%) e di mortalità (13,8%) nei pazienti colpiti.

Si è osservato un aumento statisticamente significativo dei casi confermati di listeriosi, in Unione Europea, dal 2008 al 2017, così come durante il periodo 2013-2017 (Figura 4). Il tasso di notifica è di 0,48 casi per 100000 individui, al pari del 2016.

I tassi di notifica più alti si sono registrati in Finlandia, Danimarca, Germania, Lussemburgo, Svezia e Belgio, mentre quelli più bassi sono riconducibili alla Bulgaria, Croazia, Cipro, Malta e Romania.

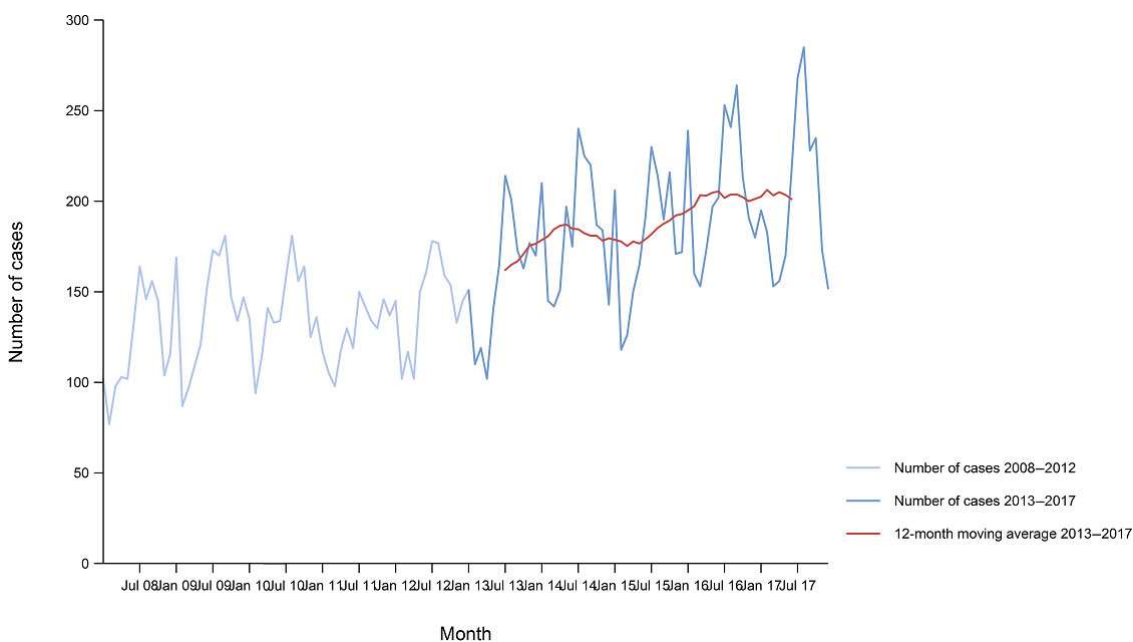


Figura 4: Trend dei casi di listeriosi umana registrati tra il 2008 e il 2017 (report EFSA, 2018).

Le persone maggiormente colpite dalla listeriosi sono state gli individui anziani, con un'età superiore ai 64 e agli 84 anni, confermando come questa categoria sia particolarmente a rischio. I casi di listeriosi nel gruppo di individui con più di 64 anni sono aumentati dal 54,8% del 2008 al 67,2% del 2017; invece nelle persone con più di 84 anni, si è passati dal 7,3% al 14,8%.

Il tasso di mortalità negli anziani al di sopra di 84 anni ha raggiunto, nel 2017, il 24,2%. L'aumento dei casi di listeriosi umana in Europa, negli ultimi anni, è in parte da attribuire all'invecchiamento generale della popolazione europea (Pagliano *et al.*, 2016). Le persone anziane sono colpite da infezioni più frequentemente rispetto al resto della popolazione, per il declino dell'attività immunitaria, sia nella sua componente cellulo-mediata sia in quella umorale.

Nel periodo compreso tra il 2008 e 2017 si è osservato un andamento stagionale nei casi di listeriosi, con un picco durante il periodo estivo. Questo probabilmente è da attribuire al cambiamento nelle abitudini alimentari dei consumatori, i quali, durante i mesi più caldi, sono soliti consumare preparazioni diverse rispetto all'inverno, come alimenti già pronti al consumo.

1.4 *Listeria monocytogenes* negli alimenti

L. monocytogenes è un microrganismo ubiquitario, frequentemente individuabile nel suolo, nelle acque e negli alimenti. Sono le matrici alimentari a costituire terreno favorevole alla crescita del microrganismo e ad essere responsabili di numerosi casi di tossinfezione.

Gli alimenti tipicamente contaminati da *L. monocytogenes* sono i ready-to-eat (RTE), definiti come “prodotti alimentari destinati dal produttore o dal fabbricante al consumo umano diretto, senza che sia necessaria la cottura o altro trattamento per eliminare o ridurre a un livello accettabile i microrganismi presenti” (Reg. CE 2073/2005, Articolo 2).

Essi sono considerati alimenti a rischio, perché vengono sottoposti a notevoli processi di manipolazione, venendo così esposti al contatto diretto con attrezzature e aree di lavorazione potenzialmente contaminate. Spesso questi alimenti subiscono processi listericidi, ma successivamente entrano in contatto nuovamente con le aree di lavorazione, prima di essere confezionati. Questo aumenta il rischio di ulteriori contaminazioni (Ferreira *et al.*, 2014).

Sono da considerare soprattutto a rischio, gli RTE con una shelf-life particolarmente lunga e mantenuti a temperature di refrigerazione (Uyttendaele *et al.*, 2009; Iannetti *et al.*, 2016; Kramarenko *et al.*, 2016), in quanto il lungo periodo di conservazione e la capacità di *L. monocytogenes* di crescere a tali temperature, rappresentano la giusta combinazione di fattori favorevoli al suo sviluppo. Anche gli RTE che non prevedono un trattamento termico prima di essere consumati, come insalate RTE, frutta e verdura, possono risultare pericolosi per la salute dei consumatori (Ziegler *et al.*, 2019).

Numerosi casi di listeriosi sono anche dovuti al mancato rispetto delle modalità d'uso degli alimenti da parte dei consumatori: è buona norma dunque prestare attenzione alle informazioni riportate in etichetta e seguirle in maniera specifica, rispettando le temperature di conservazione e la data di scadenza.

Recenti focolai di listeriosi nel mondo hanno dimostrato che anche i prodotti freschi possono essere altrettanto pericolosi: ciò è dovuto all'ubiquità del microrganismo, che colonizza facilmente il suolo e l'acqua (Figura 5). *L. monocytogenes* è stata isolata da numerosi prodotti freschi del mercato e della ristorazione, tra cui cavoli, mais, carote, lattuga, cetrioli e prezzemolo (Zhu *et al.*, 2017).

La contaminazione di frutta e verdura fresche è dovuta principalmente all'utilizzo di acqua contaminata, utilizzata per l'irrigazione delle piantagioni. L'inquinamento dell'acqua è tipicamente causato dalla presenza di feci provenienti da animali infetti (Hansen *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2017).

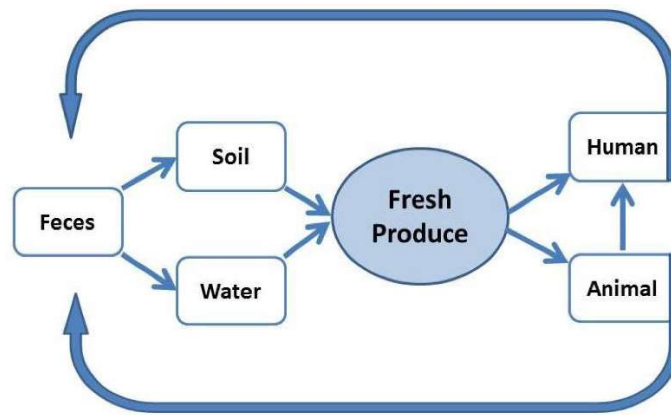


Figura 5: Trasmissione di *L. monocytogenes* all'uomo tramite il consumo di frutta e verdura (Zhu *et al.*, 2017).

Il patogeno presenta un'elevata capacità di adattamento all'ambiente: si comporta da saprofita nel suolo, ma quando viene trasmesso all'uomo o agli animali tramite il consumo di alimenti, acquista attività tossica e grazie ai numerosi fattori di virulenza, infetta le cellule.

Secondo il report EFSA, nel 2017 si sono verificati 10 focolai di listeriosi, che hanno coinvolto 39 individui e sono stati provocati dal consumo di formaggi, pesce e prodotti della pesca, verdura, carne e prodotti a base di carne, contaminati da *L. monocytogenes*.

In particolar modo, la presenza del microrganismo è stata individuata con più frequenza in: pesce e prodotti della pesca (6%), insalate RTE (4,2%), prodotti a base di carne RTE (1,8%), formaggi a pasta molle (0,9%), frutta e verdura (0,6%), formaggi a pasta dura (0,1%).

I prodotti ittici più a rischio sono: pesce affumicato a freddo, come il salmone affumicato, responsabile di numerosi casi di listeriosi, carpaccio crudo e pesce marinato (Gambarin *et al.*, 2012; Hoffman *et al.*, 2003). Tali prodotti presentano caratteristiche chimico-fisiche, come pH, a_w , temperatura e conservanti, particolarmente favorevoli alla crescita di *L. monocytogenes* (Ross *et al.*, 2000; Hwang and Tamplin, 2005).

Nel corso degli anni il consumo di prodotti ittici è aumentato notevolmente, come conseguenza delle buone proprietà nutrizionali di questi alimenti. Essi sono una fonte di proteine e lipidi, ricchi di acidi grassi insaturi, noti per ridurre il rischio di malattie cardiovascolari (Jami *et al.*, 2014; Bolivar *et al.*, 2018).

Di conseguenza il cambiamento delle abitudini alimentari dei consumatori e la capacità di *L. monocytogenes* di crescere nei prodotti ittici, hanno comportato un aumento dei controlli e una maggior attenzione da parte delle autorità competenti.

I prodotti ittici freschi possono essere contaminati a causa della presenza di *L. monocytogenes* nell'acqua, sebbene non sia un microrganismo marino oppure, più frequentemente, la contaminazione si può verificare durante il trasporto e la vendita nei mercati ittici (Jamali *et al.*, 2015).

Anche i prodotti della pesca trasformati sono alimenti a rischio, perché subiscono, durante il processo produttivo, un'elevata manipolazione. Infatti il problema *L. monocytogenes* non è solamente confinato ai prodotti alimentari, ma molto spesso sono le aree di lavorazione e le attrezzature delle aziende alimentari ad essere contaminate. Ciò è dovuto alla capacità di *L. monocytogenes* di resistere ai processi di sanificazione, essendo in grado di formare biofilm (Buchanan *et al.*, 2017).

Come riportano Aalto-Araneda *et al.* (2019), le aree di lavorazione più frequentemente contaminate da *L. monocytogenes* negli impianti di lavorazione del pesce sono: macchinari, superfici, trasportatori, utensili, pavimenti, scarichi, ma anche salamoia e indumenti da lavoro del personale.

Contaminazione e cross-contaminazioni dei prodotti ittici avvengono frequentemente durante i processi produttivi e numerosi sono i prodotti che risultano essere positivi a *L. monocytogenes*, seppur in concentrazioni minori del limite di tolleranza di 100 UFC/g (Huss *et al.*, 2000).

Negli ultimi mesi di quest'anno, si sono verificati dei casi di listeriosi, dovuti al consumo di alimenti contaminati, che hanno fatto registrare alcune vittime.

Un focolaio ha interessato cinque Paesi europei (Estonia, Danimarca, Svezia, Finlandia e Francia) ed è stato causato dal consumo di pesce affumicato a freddo, in particolare salmone e trota (<https://ilfattoalimentare.it/listeria-focolaio-salmone.html>).

Un altro focolaio di listeriosi si è verificato in Inghilterra ed ha coinvolto nove persone, per sei delle quali l'esito è stato fatale. A causare le vittime sono stati sandwich e insalate confezionate a base di pollo, distribuite negli ospedali inglesi (<https://ilfattoalimentare.it/inghilterra-listeria-ospedali.html>). A rendere la situazione drammatica è stata, probabilmente, la condizione patologica delle persone coinvolte.

Verso la fine del mese di agosto, in Andalusia (Spagna), è stata registrata un'epidemia di listeriosi, provocata dal consumo di carne di maiale, prodotta da un'azienda locale (https://www.ilmessaggero.it/mondo/listeria_carne_spagna_cosa_non_mangiare_morti_ultime_notizie_oggi_27_agosto_2019-4698609.html). Ad oggi le vittime sono due donne di 90 e 72 anni e un 74enne. Il prodotto contaminato è stato ritirato dal mercato, ma l'attenzione resta alta.

2. QUADRO NORMATIVO

2.1 Aspetti legislativi

Per garantire la salute pubblica e l'igiene dei prodotti alimentari, è stato introdotto, nel corso degli anni, un insieme di Regolamenti comunitari, con lo scopo di fornire agli operatori del settore alimentare (OSA) delle tecniche e criteri utili per la gestione dei processi produttivi.

Il Regolamento CE 178/2002, definito il Regolamento cardine del cosiddetto “pacchetto igiene”, impone l'introduzione sul mercato di alimenti non a rischio, cioè che non devono essere dannosi per la salute dei consumatori e non devono essere inadatti al consumo umano (Articolo 14, Reg. CE 178/2002).

La presenza di microrganismi nelle matrici alimentari rende queste ultime pericolose per la salute pubblica, tant'è che il Regolamento CE 2073/2005 sottolinea che “i rischi microbiologici dei prodotti alimentari costituiscono una delle principali fonti di malattie umane causate dagli alimenti”.

Tale Regolamento definisce i criteri microbiologici applicabili agli alimenti, i quali si dividono in criteri di sicurezza alimentare e igiene di processo.

Gli operatori del settore alimentare sono responsabili della produzione e distribuzione dei prodotti alimentari e per consentire l'igiene dei processi produttivi è necessario (e obbligatorio) attuare delle procedure di prevenzione volte a eliminare qualsiasi possibilità di contaminazione.

Tali strategie si basano principalmente sull'analisi del rischio (sistema HACCP) e su piani di campionamento, per rilevare l'eventuale presenza di *L. monocytogenes* in attrezzature e aree di lavorazione a rischio.

L. monocytogenes rappresenta un criterio di sicurezza, proprio per l'elevato tasso di mortalità associato alla listeriosi e alle numerose persone a rischio, che contraendo il microrganismo per via alimentare, potrebbero sviluppare gravi danni.

Il pericolo *Listeria* è individuabile, come già detto, negli alimenti pronti al consumo, i quali vengono classificati in:

- alimenti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*;
- alimenti che non costituiscono terreno favorevole alla sua crescita.

Il Regolamento CE 2073/2005 fornisce anche i parametri, indispensabili per l'OSA, per definire un alimento RTE all'interno di una delle due classi citate.

In particolare sono considerati alimenti pronti al consumo che non costituiscono terreno favorevole allo sviluppo di *L. monocytogenes* i prodotti che presentano una delle seguenti caratteristiche:

- $\text{pH} \leq 4,4$ o $a_w \leq 0,92$;

- $\text{pH} \leq 5$ e $a_w \leq 0,94$;
- periodo di conservabilità inferiore a 5 giorni, dove per conservabilità si intende “il periodo che precede il termine minimo di conservazione o la data di scadenza” (Reg. CE 2073/2005).

In questa categoria di alimenti possono rientrare anche altri prodotti, con caratteristiche di pH, a_w e periodo di conservabilità diversi da quelli sopra descritti, a patto che vi siano informazioni oggettive quali dati sperimentali e di letteratura, che lo dimostrino.

La normativa prevede che il limite da rispettare per gli alimenti che favoriscono lo sviluppo di *L. monocytogenes* sia l'assenza del microrganismo in 25 grammi, considerando 5 unità campionarie. Qualora il produttore sia “in grado di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che il prodotto non supererà il limite di 100 UFC/g durante il periodo di conservabilità” (Reg. CE 2073/2005, Allegato I, Capitolo 1), il limite imposto è di 100 UFC/g in 5 unità campionarie.

Per gli alimenti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes* il limite è di 100 UFC/g in 5 unità campionarie, se immessi sul mercato durante il periodo di conservabilità.

In aggiunta il Regolamento in questione fa riferimento ad un'altra categoria di alimenti, cioè gli “alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali”, per i quali il limite di accettabilità è l'assenza in 25 grammi in 10 unità campionarie (Tabella 1).

Categoria alimentare	Piano di campionamento		Limiti	Fase a cui si applica il criterio
	n	c		
1.1 Alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali	10	0	Assente in 25 g	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.2 Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L. monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	5	0	100 UFC/g	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
	5	0	Assente in 25 g	Prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce
1.3 Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L. monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	5	0	100 UFC/g	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

Tabella 1: Criteri di sicurezza alimentare per *L. monocytogenes* (Reg. CE 2073/2005).

Non tutti gli alimenti RTE sono però soggetti a tale criterio di sicurezza, in quanto presentano caratteristiche che non sono collegate ad una possibile crescita del microrganismo e quindi classificabili come non a rischio.

Essi vengono riportati nella nota 4 del Capitolo 1 dell'Allegato I del Regolamento CE 2073/2005 e sono:

- “alimenti che sono stati sottoposti a trattamento termico o ad altra trasformazione avente come effetto l'eliminazione di *L. monocytogenes*, quando non è possibile una ricontaminazione dopo tali trattamenti (come prodotti alimentari sottoposti a trattamento termico al momento del confezionamento finale);
- frutta e ortaggi freschi, non tagliati e non trasformati, tranne i semi germogliati;
- pane, biscotti e prodotti analoghi;
- acqua, bibite, birra, sidro, vino, bevande spiritose e prodotti analoghi imbottigliati o confezionati;
- zucchero, miele e dolci, compresi i prodotti a base di cacao e cioccolato;
- molluschi bivalvi vivi”.

Per verificare il rispetto dei criteri microbiologici lungo tutto il periodo di conservabilità, l'OSA può effettuare studi sul comportamento di *L. monocytogenes* nelle matrici alimentari pronte che costituiscono terreno favorevole alla sua crescita, "in quanto mezzo di diffusione di tale batterio" (Reg. CE 2073/2005).

Come descritto nell'Allegato II del Regolamento CE 2073/2005, gli studi che l'operatore del settore alimentare può condurre sono finalizzati alla determinazione delle caratteristiche chimico-fisiche dell'alimento, come ad esempio pH, a_w e contenuto salino, in aggiunta alla consultazione della letteratura scientifica riguardante le caratteristiche di crescita e sviluppo di *L. monocytogenes*.

Ulteriori studi che possono essere realizzati per tale scopo sono:

- "modelli matematici predittivi stabiliti per il prodotto alimentare in esame, utilizzando fattori critici di sviluppo o di sopravvivenza per i microrganismi in questione presenti nel prodotto;
- prove per determinare la capacità dei microrganismi in questione, debitamente inoculati, di svilupparsi o sopravvivere nel prodotto in diverse condizioni di conservazione ragionevolmente prevedibili;
- studi per valutare lo sviluppo o la sopravvivenza dei microrganismi in questione che possono essere presenti nel prodotto durante il periodo di conservabilità, in condizioni ragionevolmente prevedibili di distribuzione, conservazione e uso" (Allegato II, Reg. 2073/2005).

Si fa dunque chiaro riferimento alla possibilità di realizzare challenge test, che rappresentano una evidenza scientifica di come si comporta un determinato microrganismo in una matrice alimentare durante il periodo di conservabilità, con lo scopo di stabilire quindi il limite da rispettare per quello specifico prodotto, secondo il Reg. CE 2073/2005.

2.2 Challenge test

Per definizione, il challenge test consiste in una prova microbiologica di laboratorio, in cui si inocula artificialmente una certa concentrazione di microrganismo in un alimento, il quale poi viene mantenuto a precise temperature, che riproducono le normali condizioni di produzione, trasporto, distribuzione e stoccaggio. Esso ha lo scopo di valutare la capacità dell'alimento di supportare e favorire lo sviluppo del microrganismo (challenge test di prodotto) oppure di determinare come la crescita del batterio venga influenzata da un particolare processo produttivo, a cui la materia prima viene sottoposta. In quest'ultimo caso si parla di challenge test di processo, utile per la validazione dei processi produttivi (<http://www.ssica.it/content/view/179/30/lang,it/>).

È proprio il challenge test di prodotto ad essere considerato lo strumento chiave con cui l'OSA può dimostrare all'autorità competente che il prodotto alimentare in questione non supera il limite di tolleranza di 100 UFC/g per tutta la shelf-life a condizioni prevedibili di distribuzione, conservazione e uso.

Per progettare un challenge test è necessario tenere in considerazione alcuni parametri della matrice alimentare da analizzare, che normalmente vengono forniti direttamente dall'operatore del settore alimentare al laboratorio in cui il challenge test viene realizzato.

Essi sono:

- descrizione del prodotto e sua composizione;
- caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche, quali pH, a_w e microflora associata, fondamentali per valutare i cambiamenti nel prodotto durante la shelf-life;
- processo produttivo a cui la matrice viene sottoposta;
- packaging del prodotto finito;
- durata della shelf-life;
- modalità di conservazione;
- modalità di consumo.

I challenge test di prodotto possono essere utilizzati per valutare il potenziale di crescita (δ) di un microrganismo oppure per determinare il massimo tasso di crescita (μ_{max}) dello stesso.

Nel secondo caso, il challenge test consente di misurare il tasso di crescita del microrganismo in un alimento contaminato artificialmente e conservato ad una determinata temperatura, valutando la sua curva di crescita. Esso si basa sull'utilizzo della microbiologia predittiva e consente di stimare la concentrazione di *L. monocytogenes* ad un determinato giorno della shelf-life, se la concentrazione iniziale è nota. Il vantaggio nell'utilizzo di questo approccio è che una volta calcolato μ_{max} ad una data temperatura, è possibile poter predire gli altri valori di μ_{max} ad una temperatura diversa. Il difetto è invece legato al fatto di non tener conto della fase di latenza e della fase stazionaria del microrganismo.

Il challenge test per la valutazione del potenziale di crescita (δ) viene eseguito in alimenti contaminati artificialmente e conservati alle condizioni ragionevolmente prevedibili di trasporto, distribuzione e stoccaggio.

Il potenziale di crescita (δ) di *L. monocytogenes* viene definito come la differenza tra il \log_{10} della concentrazione del microrganismo espressa in UFC/g alla fine della prova e il \log_{10} della concentrazione espressa in UFC/g all'inizio della prova.

δ dipende da diversi fattori, tra i quali:

- i ceppi inoculati;

- il livello di inoculazione;
- lo stato fisiologico del ceppo usato;
- le proprietà intrinseche del campione alimentare, tra cui pH, contenuto di NaCl, a_w , microflora associata e costituenti antimicrobici;
- le caratteristiche estrinseche, come profilo tempo-temperatura, atmosfera gassosa, umidità.

Il potenziale di crescita rappresenta un parametro fondamentale per valutare la capacità dell'alimento di favorire la crescita di *L. monocytogenes*.

La suddivisione degli alimenti, attuata dal Reg. CE 2073/2005, in prodotti che favoriscono la crescita di *L. monocytogenes* e in prodotti che non la supportano, viene realizzata proprio tenendo in considerazione il valore di δ :

- se $\delta > 0,5 \log_{10}$ UFC/g, l'alimento è classificato come favorevole allo sviluppo di *L. monocytogenes*;
- se $\delta \leq 0,5 \log_{10}$ UFC/g, l'alimento non favorisce la crescita del microrganismo in questione.

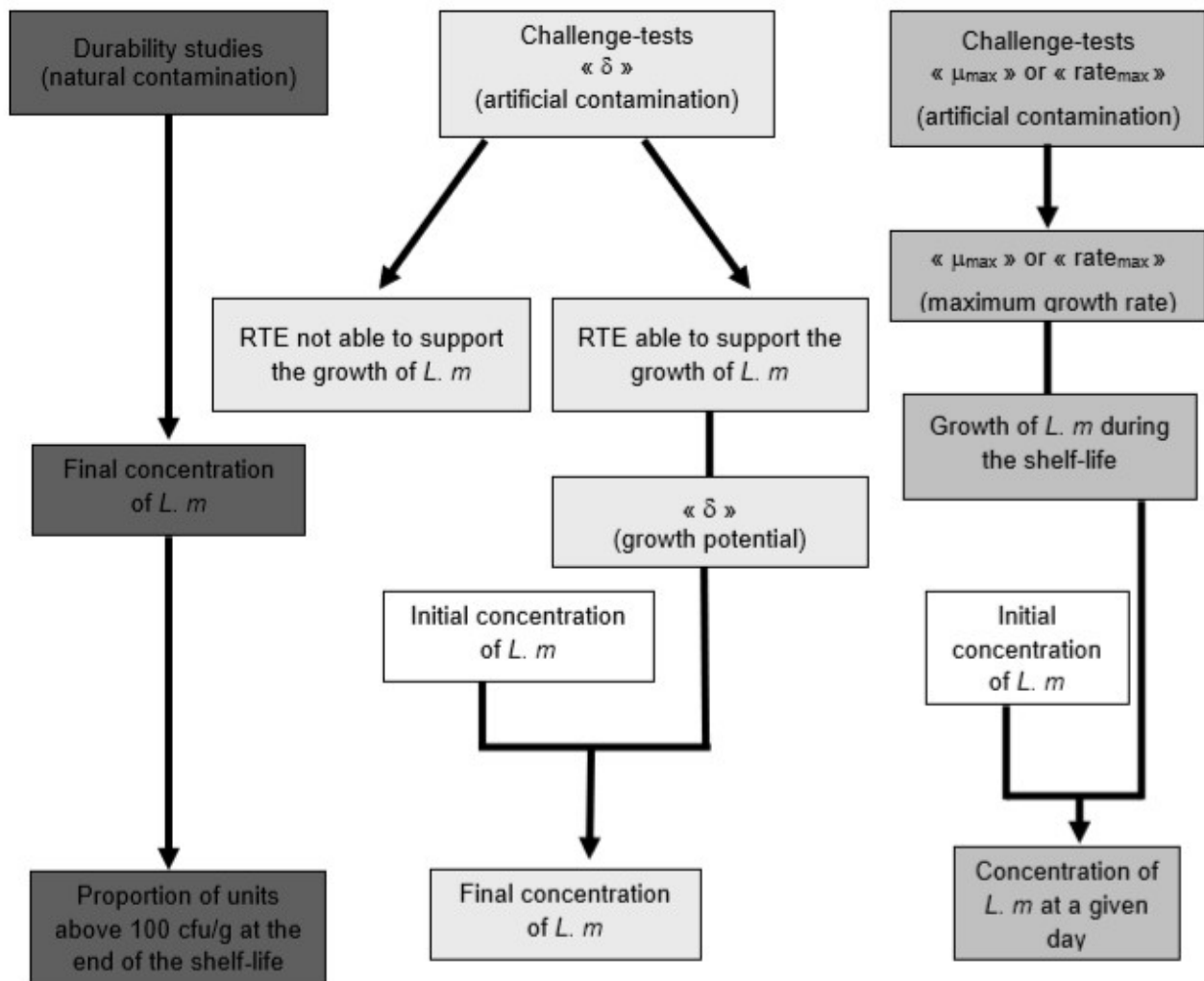
Il potenziale di crescita viene anche utilizzato per quantificare il comportamento di *L. monocytogenes* in un alimento che supporta la sua crescita, definito in base alle condizioni ragionevolmente prevedibili tra produzione e consumo.

Dunque il challenge test eseguito su una matrice alimentare ha come scopo quello di individuare il potenziale di crescita di *L. monocytogenes* e conseguentemente, sulla base del valore ottenuto, poter stabilire il limite, imposto dal Reg. CE 2073/2005, da rispettare per la corretta commercializzazione del prodotto.

Il challenge test deve inoltre mimare quanto più possibile le condizioni in cui l'alimento verrebbe a trovarsi lungo la catena del freddo, dal momento della produzione fino al consumo.

Questo tipo di studio ha come vantaggio quello di tenere in considerazione anche la fase di latenza associata alla temperatura, ma nello stesso tempo ha il limite che i risultati sono validi solamente per quel determinato prodotto, oggetto di studio, e qualsiasi cambiamento nelle condizioni di produzione, implicano la ripetizione delle prove sperimentali.

Le linee guida europee "EURL *Lm* Technical Guidance Document for conducting shelf-life studies on *L. monocytogenes* in ready-to-eat foods; Version 3 of 6 June 2014 – Amendment 1 of 21 February 2019" riassumono gli approcci metodologici per lo studio della crescita di *L. monocytogenes*, nel seguente schema:



A differenza dei challenge test, gli studi di durabilità consentono di valutare la dinamica di crescita di *L. monocytogenes* nell'alimento naturalmente contaminato, risultando quindi più realistici.

Gli studi di durabilità prevedono l'analisi, a fine shelf-life, di un certo numero di campioni alimentari, scelti tra lotti diversi e conservati in condizioni ragionevolmente prevedibili, al fine di determinare quanti campioni superano il limite di tolleranza di 100 UFC/g. Per ottenere risultati attendibili, è necessario però analizzare un numero elevato di campioni.

3. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo lavoro sperimentale è stato quello di valutare il potenziale di crescita (δ) di *L. monocytogenes* in prodotti della pesca trasformati, mediante l'utilizzo di challenge test.

La dinamica di comportamento del microrganismo è stata studiata in tre diverse preparazioni alimentari a base di prodotti ittici pronte al consumo: un'insalata di mare e legumi, e un carpaccio di seppia, entrambi forniti dall'azienda ittica FIORITAL S.p.A con sede a Venezia e un salmone in insalata con olive verdi, prodotto da un'altra azienda ittica veneta.

Le prove sono state condotte dal Laboratorio IZSve della sezione di San Donà di Piave su richiesta delle stesse aziende produttrici.

Il challenge test costituisce infatti uno strumento fondamentale con cui l'operatore del settore alimentare (OSA) può dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che il prodotto alimentare, che per caratteristiche di pH e attività dell'acqua costituisce terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*, in realtà non supera il limite di tolleranza di 100 UFC/g durante il periodo di conservabilità, potendo così commercializzare il prodotto nel rispetto della normativa vigente (Reg. CE 2073/2005).

L'insalata di mare e legumi, il carpaccio di seppia e il salmone in insalata con olive verdi sono alimenti pronti al consumo e come tali considerati a rischio, perché nonostante il processo produttivo preveda una fase di cottura, l'elevata manipolazione degli ingredienti successiva al trattamento termico può essere motivo di cross-contaminazioni.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare il potenziale di crescita (δ) di *L. monocytogenes* e confrontarlo con il valore di riferimento di 0,5 log₁₀ UFC/g come riportato nelle linee guida dell'EURL *Lm*; a tale scopo il patogeno è stato inoculato nei prodotti e ne è stata determinata la curva di crescita durante l'intera shelf-life.

Per l'esecuzione del challenge test nell'insalata di mare e legumi sono state seguite le linee guida del Laboratorio di Riferimento europeo per *L. monocytogenes* "EURL *Lm* Technical Guidance Document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods; Version 3 of 6 June 2014"; nel caso invece del carpaccio di seppia e del salmone in insalata con olive verdi, è stata utilizzata la versione aggiornata di febbraio 2019 delle stesse linee guida ("EURL *Lm* Technical Guidance Document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods; Version 3 of 6 June 2014 – Amendment 1 of 21 February 2019"), nelle quali si osserva una modifica nelle temperature di conservazione dei campioni alimentari.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Descrizione dei campioni alimentari

L'insalata di mare e legumi era una preparazione alimentare RTE a base di prodotto ittico e legumi cotti, dal peso di 240 grammi per confezione (Figura 6), confezionata in atmosfera modificata (ATM).

Gli ingredienti principali erano: seppia, mazzancolla, cozza, soia, ceci, fagioli rossi, olio.

La shelf-life assegnata al prodotto era di 12 giorni, mentre la temperatura di conservazione prevista in etichetta era 0/4°C.



Figura 6: Insalata di mare e legumi FIORITAL S.p.a.

Il carpaccio di seppia, anch'esso RTE, era confezionato in vaschette da 130 grammi, conservato in ATM (Figura 7). Gli ingredienti che lo componevano erano seppia cotta e olio.

La shelf-life era di 12 giorni e la temperatura di conservazione prevista era 0/4°C.



Figura 7: Carpaccio di seppia FIORITAL S.p.a.

Il salmone in insalata con olive verdi era una preparazione alimentare RTE a base di salmone cotto affumicato, insalata, pomodorini e olive (Figura 8). Le vaschette avevano un peso di 200 grammi l'una, confezionate in ATM.

La shelf-life assegnata era di 6 giorni e la temperatura di conservazione era 0/4°C, come da etichetta.



Figura 8: Salmone in insalata con olive verdi.

4.2 Scelta dei ceppi di *Listeria monocytogenes*

Secondo quanto riportato nelle linee guida dell'EURL *Lm*, per la contaminazione dei campioni alimentari si utilizza un mix di almeno due ceppi batterici, in modo da considerare la variabilità di crescita di ceppi diversi.

Un ceppo di *L. monocytogenes* è stato fornito dal Laboratorio Nazionale di Riferimento per *L. monocytogenes* dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" –

Teramo, che collabora con il Laboratorio Comunitario di Riferimento per *L. monocytogenes* (EURL *Lm*, ANSES-Parigi). Il secondo ceppo era un ceppo di campo, isolato in precedenza dal Laboratorio di San Donà di Piave, da altri prodotti della pesca risultati positivi per *L. monocytogenes*.

Il ceppo EURL viene selezionato da una lista di ceppi, caratterizzati nel loro tasso di crescita in funzione della matrice alimentare di provenienza, delle condizioni di temperatura, pH e a_w e in base ai genotipi genetici.

È importante che entrambi i ceppi, che vengono inoculati, derivino da prodotti ittici, in modo da riprodurre il più possibile una contaminazione naturale dell'alimento.

Per l'insalata di mare e legumi, sono stati utilizzati il ceppo EURL 12MOB101LM, il ceppo di campo 5356/1-2017 per la contaminazione del lotto 1 e isolato da un'insalata di polpo positiva per *L. monocytogenes*, mentre per il lotto 2 e 3 è stato scelto il ceppo 3340/1-2018, isolato dai controlli negativi dell'insalata di mare e legumi del lotto 1, risultati positivi per *L. monocytogenes*.

Anche per il carpaccio di seppia e il salmone in insalata con olive verdi, è stato utilizzato il ceppo EURL 12MOB101LM, mentre per il ceppo di campo sono stati scelti rispettivamente il ceppo 3340/1-2018 e il ceppo 1034/8-2014, isolati da matrici alimentari simili a quelle oggetto di studio.

4.2.1 Preparazione dell'inoculo

I ceppi scelti per l'inoculo sono stati conservati congelati all'interno di cryobeads: prima del loro utilizzo, i ceppi sono stati scongelati e seminati in due terreni a diverso livello di selettività per valutare la purezza e la vitalità del microrganismo: l'ALOA (Agar *Listeria* acc. to Ottaviani & Agosti, terreno selettivo, cromogeno e differenziale) per la valutazione della purezza di *L. monocytogenes* e il TSAYE (Tryptone Soy Yeast Extract Agar), nutriente ma specifico per *Listeria*.

Le cryobeads del ceppo EURL e di campo sono state seminate nelle piastre di ALOA e TSAYE, le quali poi vengono incubate a 37°C per 24 h (Figure 9-10).



Figura 9: *L. monocytogenes* in terreno ALOA.



Figura 10: *L. monocytogenes* in terreno TSAYE.

Dopo aver verificato la purezza e vitalità di entrambi i ceppi, sono state preparate delle brodocolture in terreno BHI (Brain Heart Infusion Broth). Per ogni ceppo, sono stati preparati 9 mL di BHI, in cui è stata stemperata un'ansata di *L. monocytogenes* dal terreno TSAYE.

Le provette sono state incubate a 37°C per 15-18 h, con lo scopo di portare tutte le cellule allo stesso stato fisiologico.

Al termine del periodo di incubazione è stata raggiunta la fase stazionaria, nella quale la concentrazione del microrganismo era pari a $9,20 \log_{10}$ UFC/mL ($1,5 \cdot 10^9$ UFC/mL). Tale valore è stato determinato a seguito di numerose prove, realizzate dallo stesso Laboratorio Comunitario di Riferimento per *L. monocytogenes*.

Sono stati prelevati dunque 0,1 mL dalla provetta che rappresentava la fase stazionaria del ceppo EURL e del ceppo di campo e inseriti ciascuno in altri 9 mL di BHI. Queste provette sono state poi incubate a 10° C per 3 giorni, in modo che *L. monocytogenes* raggiungesse la fase stazionaria e si adattasse alle condizioni di refrigerazione, in cui poi doveva crescere nell'alimento da testare (Figura 11).

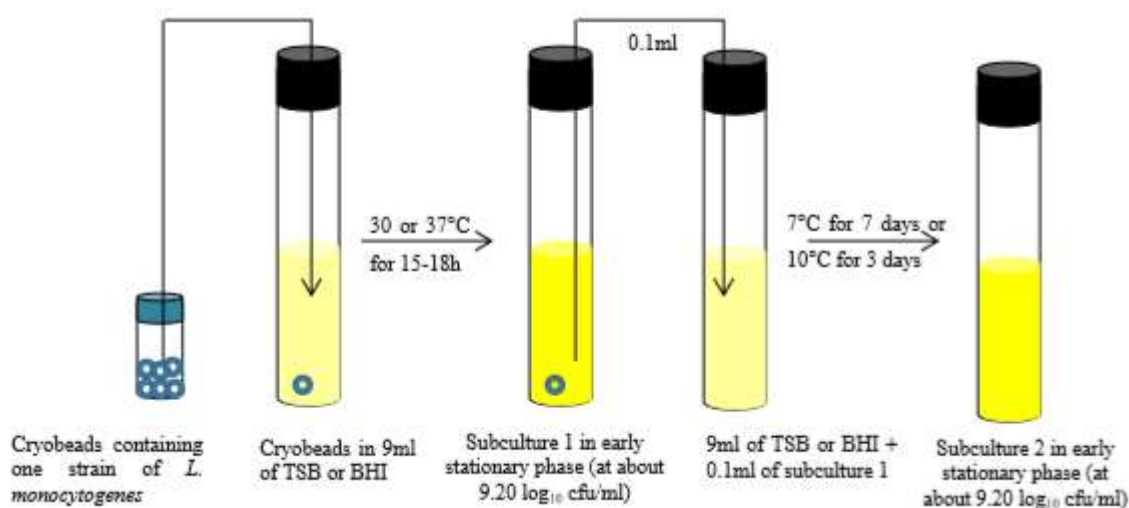


Figura 11: Preparazione delle brodoculture di *L. monocytogenes* in BHI (EURL Lm, 2014).

Il mix di *L. monocytogenes* da usare per la contaminazione dell'alimento è stato realizzato miscelando in parti uguali le brodoculture in stato stazionario, mantenute a 10° C, del ceppo EURL e di quello di campo.

È stato scelto di inoculare, nelle matrici alimentari, una concentrazione di circa 80 UFC/g del microrganismo; partendo dal mix dei due ceppi di *L. monocytogenes* alla concentrazione di $1,5 \cdot 10^9$ UFC/mL, sono state allestite successive diluizioni fino ad ottenere la concentrazione adeguata da inoculare nei campioni alimentari.

La sospensione di inoculo ottenuta è stata poi seminata in piastre di ALOA e si è proceduto all'analisi quantitativa di *L. monocytogenes*, per verificare di aver raggiunto la corretta concentrazione di inoculo.

4.2.2 Tipizzazione sierologica di *L. monocytogenes*

La tipizzazione è stata eseguita per il ceppo di campo 3340/1-2018, utilizzato per la contaminazione dell'insalata di mare e legumi e per il carpaccio di seppia.

La tipizzazione sierologica consente di individuare il sierotipo del ceppo di *L. monocytogenes*, valutando l'agglutinazione della sospensione batterica con gli antisieri O e H.

La valutazione dell'agglutinazione è stata realizzata separatamente per l'antigene O (catena polisaccaridica della membrana cellulare batterica) e H (proteina flagellare).

La procedura per la realizzazione della prova è un metodo sviluppato internamente all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Tabella 2-3), sulla base del lavoro di Seeliger & Hohne (1979).

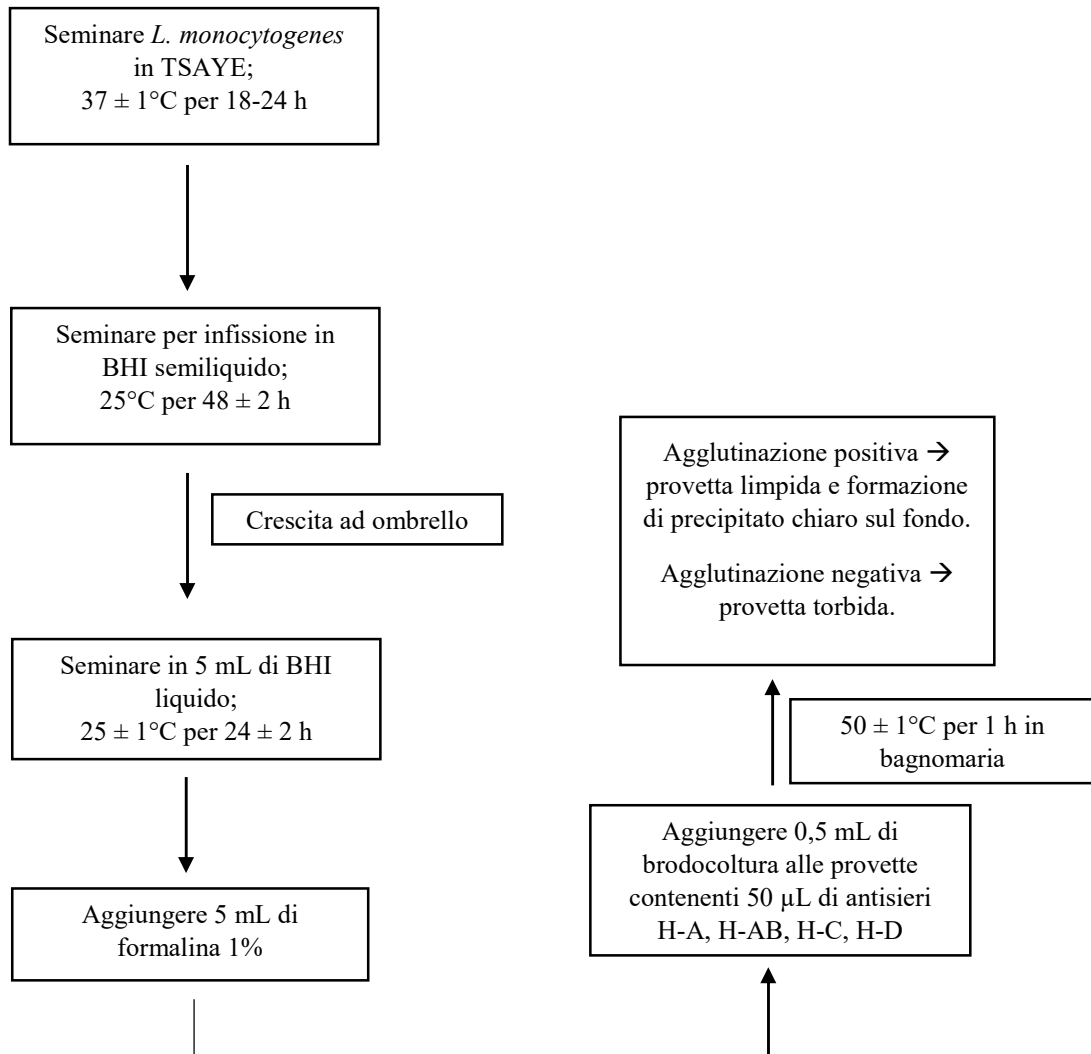


Tabella 2: Procedura per l'agglutinazione dell'antigene flagellare H.

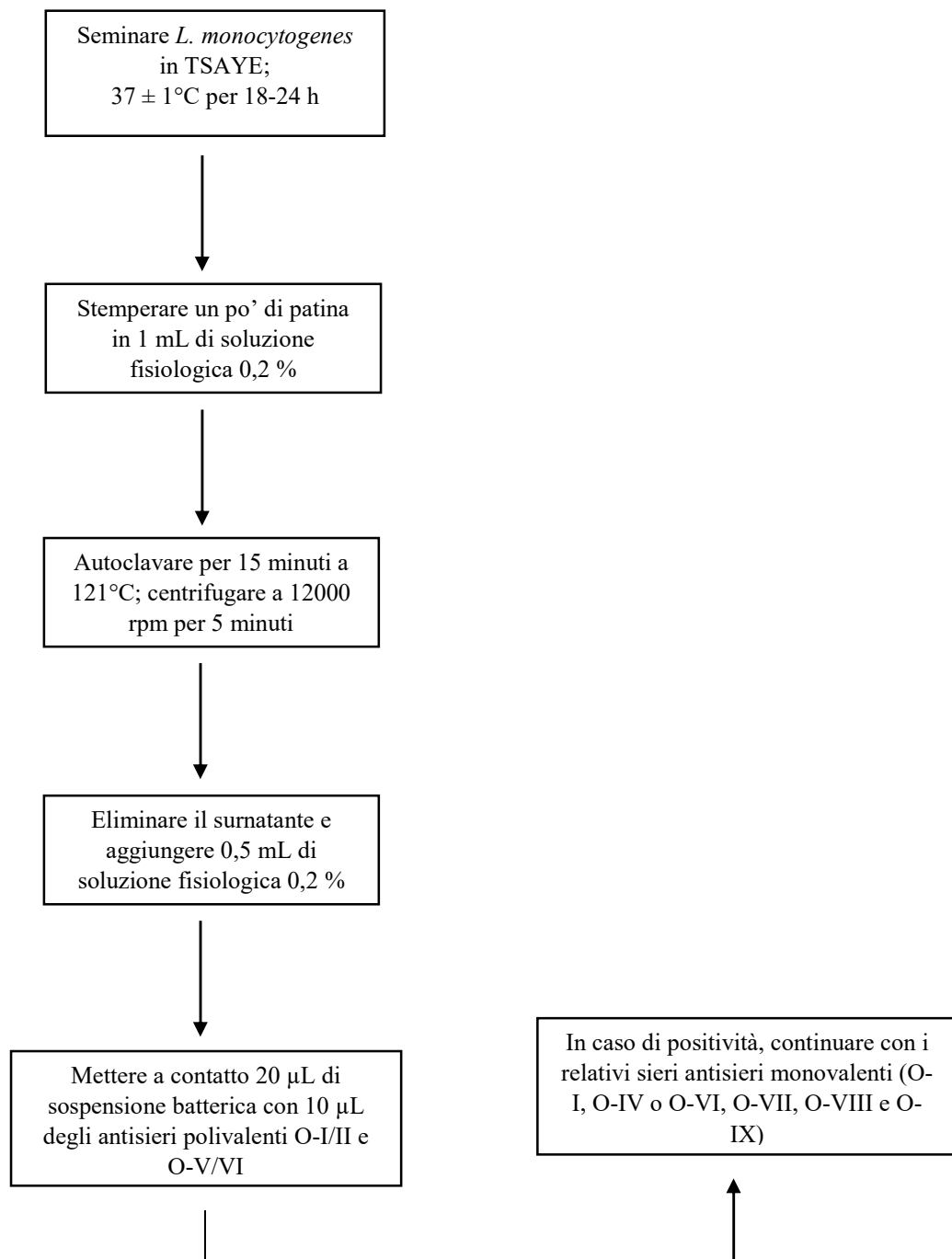


Tabella 3: Procedura per l'agglutinazione dell'antigene somatico O.

L'agglutinazione dell'antisiero O e H hanno consentito di classificare il ceppo di *L. monocytogenes* 3340/1-2018 come sierotipo 3a (Figura 12), risultando positivo agli antisieri H-A e H-AB e agli antisieri O-I/II e O-IV.

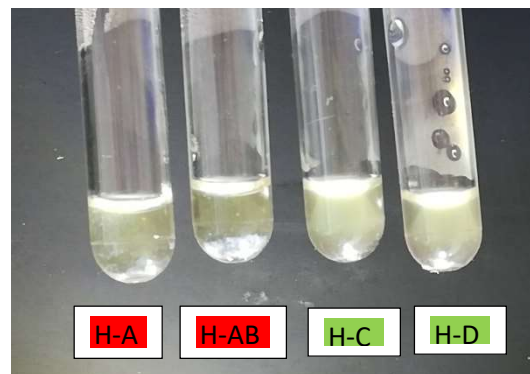


Figura 12: Agglutinazione dell'antigene H.

Il ceppo è positivo per gli antisieri H-A e H-AB (in rosso), negativo per H-C e H-D (in verde).

Il sierotipo 3a non è riconducibile al gruppo di sierotipi associati alla maggior parte dei casi di listeriosi umana (1/2a, 1/2b, 4b), dunque la sua naturale presenza nella matrice alimentare rappresenta un segnale di attenzione, ma non è motivo di allarme.

4.3 Modalità di contaminazione sperimentale

La contaminazione artificiale dei campioni è uno degli step più importanti e critici di un challenge test. È fondamentale ricreare le normali condizioni di sviluppo e crescita di *L. monocytogenes* nell'alimento, così da ottenere dei risultati affidabili.

Il volume di inoculo non deve superare l'1% del peso del campione alimentare, in modo tale da non alterare le caratteristiche chimico-fisiche dello stesso.

Poiché l'inoculo deve essere distribuito in maniera quanto più possibile omogenea nel campione, le modalità con cui inoculare il microrganismo nell'alimento sono diverse e dipendono dalla conformazione del prodotto stesso.

Nel caso dell'insalata di mare e legumi, dove tutti i vari ingredienti erano mescolati tra loro, è stato scelto di trasferire l'inoculo in più punti, direttamente dentro la confezione, mediante l'utilizzo di una

siringa e di un setto di gomma, ricoperto poi da un altro setto in modo da non consentire la fuoriuscita di gas e non alterare l'atmosfera della confezione.

Per il carpaccio di seppia, invece, la confezione è stata aperta: la sospensione batterica è stata inoculata tramite l'uso di una micropipetta, tra una fettina e l'altra; il prodotto è stato poi riconfezionato in ATM con la stessa composizione gassosa iniziale.

Anche per il salmone in insalata con olive verdi è stato scelto di trasferire l'inoculo tramite micropipetta e la sospensione è stata distribuita in maniera omogenea tra tutti gli ingredienti.

4.4 Modalità di conservazione dei campioni

Come descritto precedentemente, il challenge test deve mimare le condizioni in cui normalmente i prodotti alimentari verrebbero tenuti se destinati alla commercializzazione e al consumo.

La temperatura di conservazione degli alimenti è fondamentale, perché influisce sulla crescita di *L. monocytogenes*: per questo motivo i campioni inoculati con il microrganismo vengono mantenuti a temperature diverse, che riproducono le fasi di trasporto, distribuzione e stoccaggio.

È inoltre cura dell'operatore del settore alimentare stabilire la durata della shelf-life dell'alimento e indicare le temperature di conservazione dei campioni sulla base delle informazioni a disposizione sulla storia termica del prodotto; in caso contrario sono le linee guida a indicarle.

L'insalata di mare e legumi è stata conservata a + 8°C per tutta la durata del challenge test. Tale temperatura è stata scelta in base ad alcune valutazioni, fatte in merito allo standard IFS Food (standard relativo alla sicurezza alimentare), alle buone prassi igieniche aziendali, ai controlli qualitativi sui prodotti e sui luoghi di produzione.

Il periodo di monitoraggio dei campioni è stato di 12 giorni (durata della shelf-life del prodotto), esteso fino al quattordicesimo giorno, in forma cautelare.

Il carpaccio di seppia è stato conservato secondo quanto riportato dalle linee guida dell'EURL *Lm*, nella versione aggiornata al 21 Febbraio 2019. Poiché la shelf-life era di 12 giorni, i campioni sono stati mantenuti per i due terzi della loro vita commerciale a + 7°C, mentre per l'ultimo terzo a + 12°C.

Anche in questo caso, la prova è stata prolungata fino al quattordicesimo giorno a titolo cautelativo.

Per il salmone in insalata con olive verdi sono state seguite le linee guida dell'EURL *Lm* aggiornate, dunque il prodotto è stato conservato a + 7°C per i due terzi della vita commerciale e poi a + 12°C (shelf-life di 6 giorni). Il periodo di monitoraggio è stato esteso fino all'ottavo giorno.

L'aggiornamento delle linee guida dell'EURL *Lm* è stato necessario a seguito di alcuni studi che hanno consentito di individuare le temperature medie a cui vengono mantenuti i frigoriferi domestici.

Secondo tali studi la temperatura media è di + 7°C per i Paesi dell'Europa meridionale, mentre per l'Europa settentrionale è di + 6,1°C (Roccatò, 2017). Per questo motivo le temperature di abuso termico (8/12°C) previste dalle linee guida dell'EURL *Lm* del 2014 erano troppo sfavorevoli e si è dunque deciso di modificarle per rendere le condizioni di conservazione, adottate nei challenge test, più in linea con i dati di letteratura.

4.5 Piano di campionamento

Per l'insalata di mare e legumi, sono stati analizzati 3 diversi lotti: ciascun lotto comprendeva 6 controlli negativi (campioni non inoculati); nel primo lotto sono stati analizzati 9 campioni inoculati con *L. monocytogenes*, mentre per il secondo e terzo lotto sono stati considerati 15 campioni inoculati. Per ogni lotto inoltre sono state allestite le brodoculture di controllo, conservate alla stessa temperatura dei campioni alimentari e testate secondo lo stesso calendario, con lo scopo di valutare la vitalità dei ceppi batterici.

Il primo lotto di insalata di mare e legumi è stato campionato in tre momenti diversi della vita commerciale: inizio della shelf-life (T1), fine della shelf-life (T2) e quattordicesimo giorno di vita (T3); mentre per gli altri due lotti, le analisi sono state eseguite all'inizio della shelf-life (T1), dopo 5 (T2) e 8 (T3) giorni di vita, alla fine della shelf-life (T4) e quattordicesimo giorno di vita (T5), (Tabelle 4-5).

Per il carpaccio di seppia, è stato analizzato un unico lotto, comprendente 6 controlli negativi e 15 campioni inoculati. Anche in questo caso, sono state tesate le relative brodoculture per verificare la vitalità dei ceppi batterici utilizzati. Le analisi sono state eseguite ad inizio shelf-life (T1), dopo 5 (T2) e 8 (T3) giorni dalla produzione, a fine shelf-life (T4) e al quattordicesimo giorno (T5), (Tabella 5).

L'unico lotto di salmone in insalata con olive verdi analizzato comprendeva 9 controlli negativi e 12 campioni contaminati, in aggiunta alle relative brodoculture. I campionamenti sono stati eseguiti ad inizio shelf-life (T1), dopo 4 giorni di vita (T2), a fine shelf-life (T3) e all'ottavo giorno (T4), (Tabella 6).

Per ogni singola matrice alimentare, si è proceduto alle seguenti analisi:

- ricerca di *L. monocytogenes* mediante Real Time PCR (AFNOR BRD 07/10 – 04/05) ed eventuale conferma colturale in caso di positività in PCR;
- analisi quantitativa colturale di *L. monocytogenes* (ISO 11290-2:2017);
- conta dei microrganismi mesofili a 30°C (ISO 4833-1:2013);

- conta dei batteri lattici a 30°C (metodo interno IZSVe, MRSbl a 30°C in aerobiosi per 72 h);
- pH (MFHPB-03:2014);
- a_w (ISO 18787:2017).

Campioni	Analisi	N. unità campionarie da testare		
		T1	T2	T3
Non contaminati artificialmente	Ricerca di <i>L. monocytogenes</i> a 37°C mediante Real Time PCR	3	3	/
	Microrganismi mesofili a 30°C	1	1	/
	Batteri lattici a 30°C	1	1	/
	pH	1	1	/
	a_w	1	1	/
Contaminati artificialmente	Conta di <i>L. monocytogenes</i> a 37°C	3	3	3
	Microrganismi mesofili a 30°C	1	1	1
	Batteri lattici a 30°C	1	1	1
	pH	1	1	1
	a_w	1	1	1

Tabella 4: Piano di campionamento per il lotto 1-insalata di mare e legumi.

Campioni	Analisi	N. unità campionarie da testare				
		T1	T2	T3	T4	T5
Non contaminati artificialmente	Ricerca di <i>L. monocytogenes</i> a 37°C mediante Real Time PCR	3	/	/	3	/
	Microrganismi mesofili a 30°C	1	/	/	1	/
	Batteri lattici a 30°C	1	/	/	1	/
	pH	1	/	/	1	/
	a _w	1	/	/	1	/
Contaminati artificialmente	Conta di <i>L. monocytogenes</i> a 37°C	3	3	3	3	3
	Microrganismi mesofili a 30°C	1	1	1	1	1
	Batteri lattici a 30°C	1	1	1	1	1
	pH	1	1	1	1	1
	a _w	1	1	1	1	1

Tabella 5: Piano di campionamento per il lotto 2 e 3-insalata di mare e legumi e per il lotto 1-carpaccio di seppia.

Campioni	Analisi	N. unità campionarie da testare			
		T1	T2	T3	T4
Non contaminati artificialmente	Ricerca di <i>L. monocytogenes</i> a 37°C mediante Real Time PCR	3	/	3	3
	Microrganismi mesofili a 30°C	1	/	1	1
	Batteri lattici a 30°C	1	/	1	1
	pH	1	/	1	1
	a _w	1	/	1	1
Contaminati artificialmente	Conta di <i>L. monocytogenes</i> a 37°C	3	3	3	3
	Microrganismi mesofili a 30°C	1	1	1	1
	Batteri lattici a 30°C	1	1	1	1
	pH	1	1	1	1
	a _w	1	1	1	1

Tabella 6: Piano di campionamento per il lotto 1-salmone in insalata con olive verdi.

In accordo con le linee guida dell'EURL *Lm*, l'analisi quantitativa di *L. monocytogenes* nei campioni contaminati artificialmente è stata eseguita in triplicato, con lo scopo di considerare la possibile variabilità legata alla distribuzione del patogeno nel prodotto; mentre l'analisi dei microrganismi mesofili, dei batteri lattici e delle caratteristiche chimico-fisiche sono state realizzate, sia nei campioni non inoculati sia in quelli contaminati, in pool di tre unità campionarie.

4.6 Analisi molecolari e microbiologiche

4.6.1 Analisi qualitativa di *L. monocytogenes* mediante Real Time PCR (AFNOR BRD 07/10 – 04/05)

La ricerca di *L. monocytogenes* mediante Real Time PCR è stata eseguita per i campioni alimentari non inoculati con il microrganismo. Tali campioni devono essere negativi alla presenza di *L. monocytogenes*, altrimenti i risultati del challenge test sono da considerare non validi.

La ricerca è stata condotta utilizzando il kit commerciale IQ-Check™ *Listeria monocytogenes* II kit Bio Rad (AFNOR BRD 07/10 – 04/05); il metodo prevede una prima fase di preparazione del campione e pre-arricchimento, una fase di estrazione del DNA batterico ed infine l'amplificazione genetica tramite Real Time PCR (Tabella 7).

Il kit è composto dai seguenti reagenti:

- Lysis reagent;
- Fluorescent Probes;
- Amplification mix;
- PCR negative control (NTC);
- PCR positive control (PTC);
- Lysis beads.

Oltre ai campioni da analizzare, sono stati testati anche:

- controllo positivo di processo (PPC): sospensione batterica del ceppo di *L. monocytogenes* in LSB (*Listeria Special Broth*);
- controllo negativo di processo (NPC): solo terreno LSB;
- controllo negativo di amplificazione: aliquota contenente tutti i reagenti necessari alla PCR in aggiunta al “PCR negative control”;
- controllo positivo di amplificazione: aliquota contenente tutti i reagenti necessari alla PCR in aggiunta al “PCR positive control”;

- controllo positivo di processo con pre-arricchimento (PPCP): matrice naturalmente o artificialmente contaminata da *L. monocytogenes*.

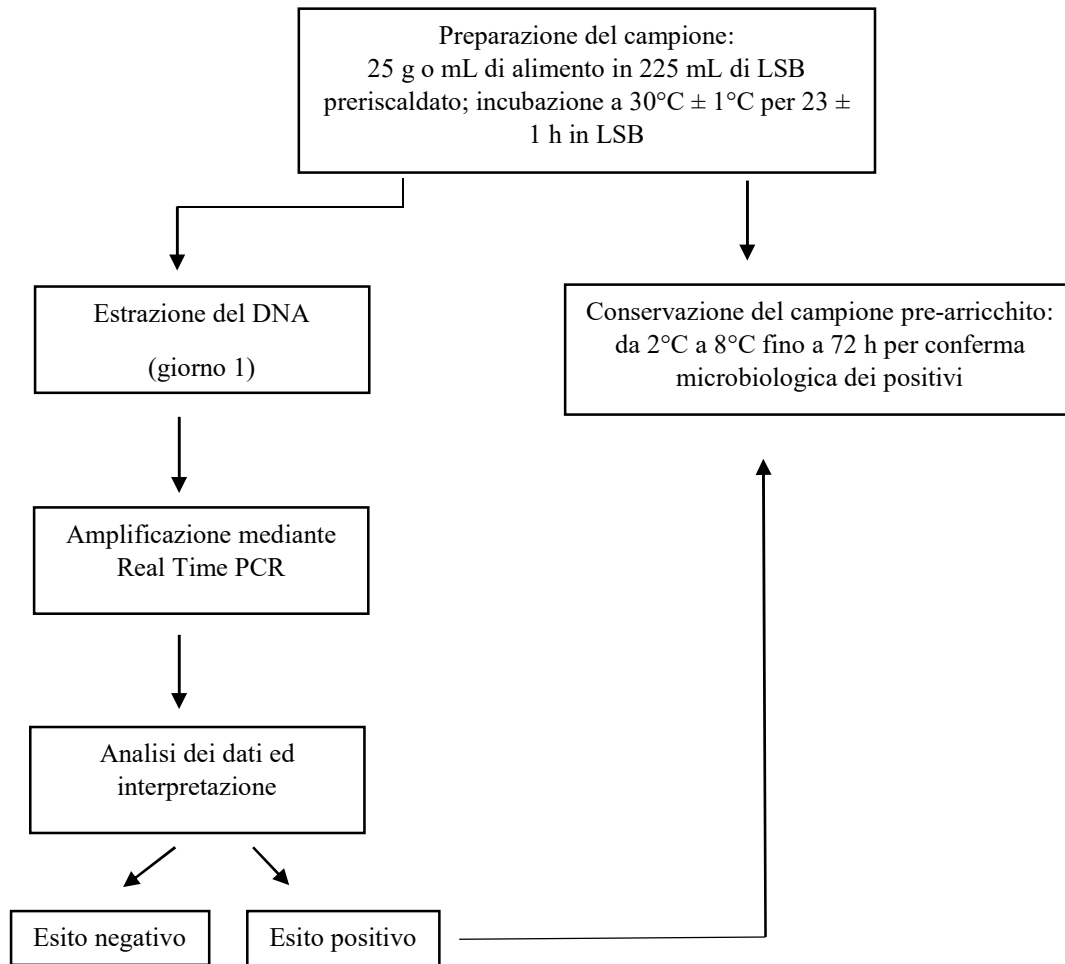


Tabella 7: Fasi per la ricerca di *L. monocytogenes* mediante Real Time PCR.

Il profilo termico utilizzato per l'amplificazione mediante PCR è stato il seguente:

Fase	Temperatura	Tempo	Numero di cicli
Denaturazione iniziale	95°C	10 minuti	1
Denaturazione	95°C	15 secondi	50
Annealing	58°C	20 secondi	
Estensione	72°C	30 secondi	

L'interpretazione dei risultati si basa sull'analisi della conformità dei controlli e dei valori di Ct corrispondenti ad ogni singolo campione.

I controlli sono conformi se:

	Ct <i>L. monocytogenes</i> (FAM)	Ct controllo interno (HEX)
NTC	Ct=N/A	$28 \leq Ct \leq 40$
PTC	$26 \leq Ct \leq 36$	Non significativo
NPC	Ct=N/A	$Ct \geq 28$
PPC/PPCP	$Ct > 10$	Non significativo

I campioni analizzati sono da considerarsi positivi quando le curve di fluorescenza associate a *L. monocytogenes* presentano un valore di $Ct \geq 10$. I campioni sono negativi quando il controllo interno presenta $Ct \geq 28$ e se si verifica una delle seguenti condizioni:

- il campione non presenta Ct (Ct=N/A) associato alla curva di amplificazione per *L. monocytogenes*;
- la curva di fluorescenza non ha la forma di una tipica curva di amplificazione.

In caso di positività, i campioni sono stati sottoposti alla conferma colturale mediante semina del prearricchimento su terreno ALOA e su terreno cromogenico RAPID'*L. mono* (metodo AFNOR). Dopo incubazione a 37°C per 24 ore, le colonie di *L. monocytogenes* in RAPID'*L. mono* appaiono di colore blu, dato dall'attività della fosfolipasi PI-PLC e senza aloni gialli (*L. monocytogenes* non è in grado di fermentare lo xilosio).

Per un'ulteriore conferma le colonie di *L. monocytogenes* vengono seminate in Agar sangue, per osservare la tipica β -emolisi.

4.6.2 Analisi quantitativa colturale di *L. monocytogenes* (ISO 11290-2:2017)

L'analisi quantitativa di *L. monocytogenes* è stata eseguita sia nei campioni non inoculati con il microrganismo, ma positivi alla Real Time PCR e alla successiva analisi qualitativa colturale, sia nei campioni contaminati artificialmente.

La conta di *L. monocytogenes* nei campioni non inoculati è stata necessaria per stabilire l'entità della contaminazione naturale e quindi se fosse tale da poter interferire con l'interpretazione dei risultati del challenge test.

La procedura di riferimento è la ISO 11290-2:2017 (Tabella 8).

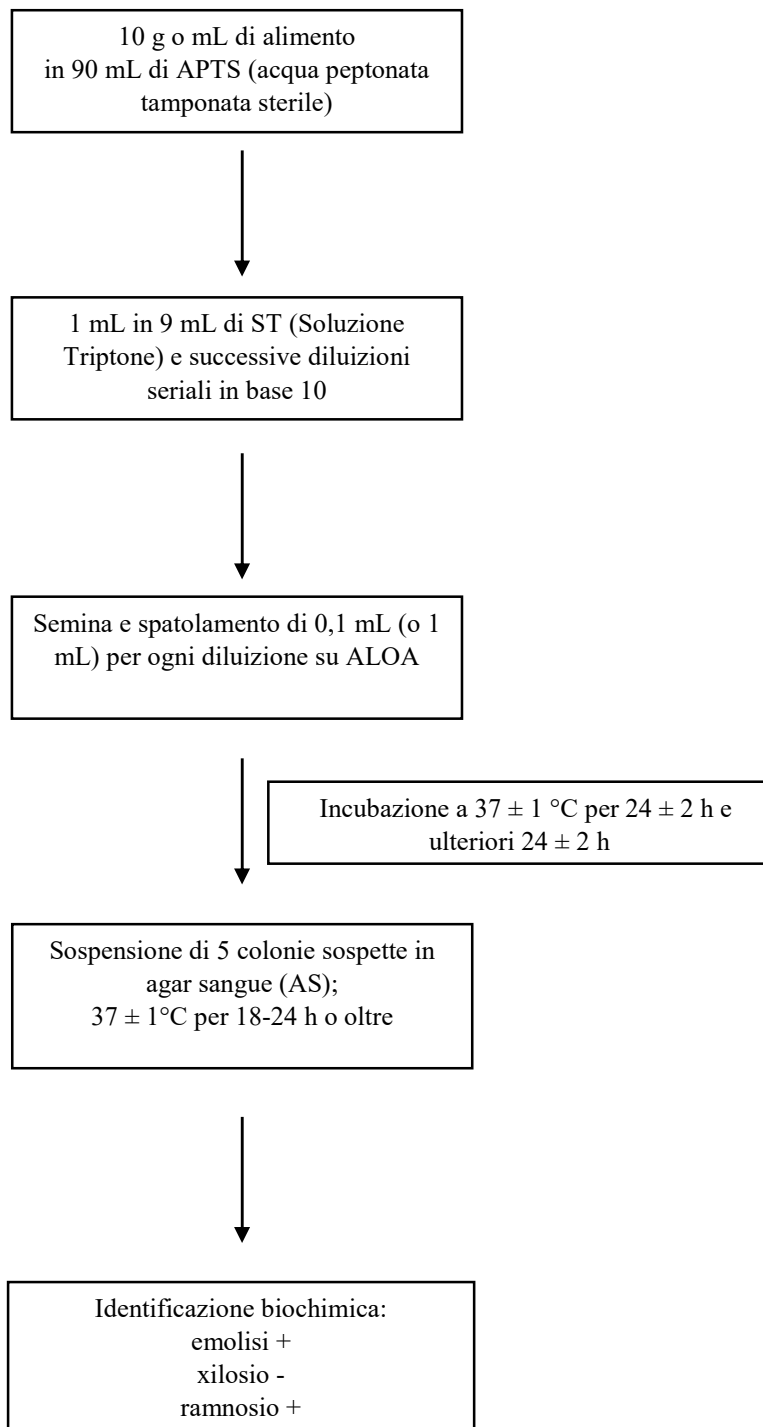


Tabella 8: Fasi per la conta di *L. monocytogenes* a 37°C.

I campioni inoculati con *L. monocytogenes* sono stati invece analizzati per determinare la conta del microrganismo, necessaria per il calcolo del potenziale di crescita.

Nel dettaglio, l'intera massa del campione è stata pesata e portata a volume con APTS (acqua peptonata tamponata sterile). Dopo omogenizzazione mediante Stomacher per 30 secondi, sono stati trasferiti 0,4, 0,3, 0,3 mL della diluizione 10^{-1} del campione nelle relative piastre di ALOA, per poi procedere alle successive diluizioni.

La semina è stata eseguita per spatolamento, avendo cura di non toccare i bordi della piastra.

Le colonie di *L. monocytogenes* in ALOA appaiono di colore verde-azzurro, circondate da un alone opaco, dato dall'attività delle fosfolipasi (Figura 13).



Figura 13: *L. monocytogenes* quantitativa in terreno ALOA.

Come test tipico di conferma, è stata valutata l'emolisi di *L. monocytogenes* in Agar sangue: il microrganismo mostrava una limitata zona trasparente, che rappresenta la β -emolisi.

Per l'identificazione biochimica, è stato eseguito il test MicrobactTM Listeria 12L. La sospensione batterica, realizzata a partire dalle colonie prelevate dall'Agar sangue, è stata distribuita nei pozzetti, contenenti diversi reagenti, i quali, dopo un periodo di incubazione a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore, danno vita a reazioni, che si traducono in viraggi di colorazione. *L. monocytogenes* si distingue per la capacità di fermentare il ramnosio, ma non lo xilosio.

Successivamente alla conferma e identificazione biochimica, si è proceduto dunque al calcolo del risultato finale, prendendo in considerazione le piastre che contenevano meno di 150 colonie, una delle quali contenente almeno 10 colonie.

4.6.3 Analisi quantitativa dei microrganismi mesofili a 30°C (ISO 4833-1:2013)

La conta dei microrganismi mesofili a 30°C è stata eseguita sia nei campioni non inoculati sia in quelli contaminati con *L. monocytogenes*.

Tale analisi ha consentito di valutare la presenza e il numero di microrganismi associati all'alimento, alcuni dei quali avrebbero potuto interferire con la crescita di *L. monocytogenes*.

Il metodo adottato dal laboratorio è il metodo ISO 4833-1:2013 (Tabella 9).

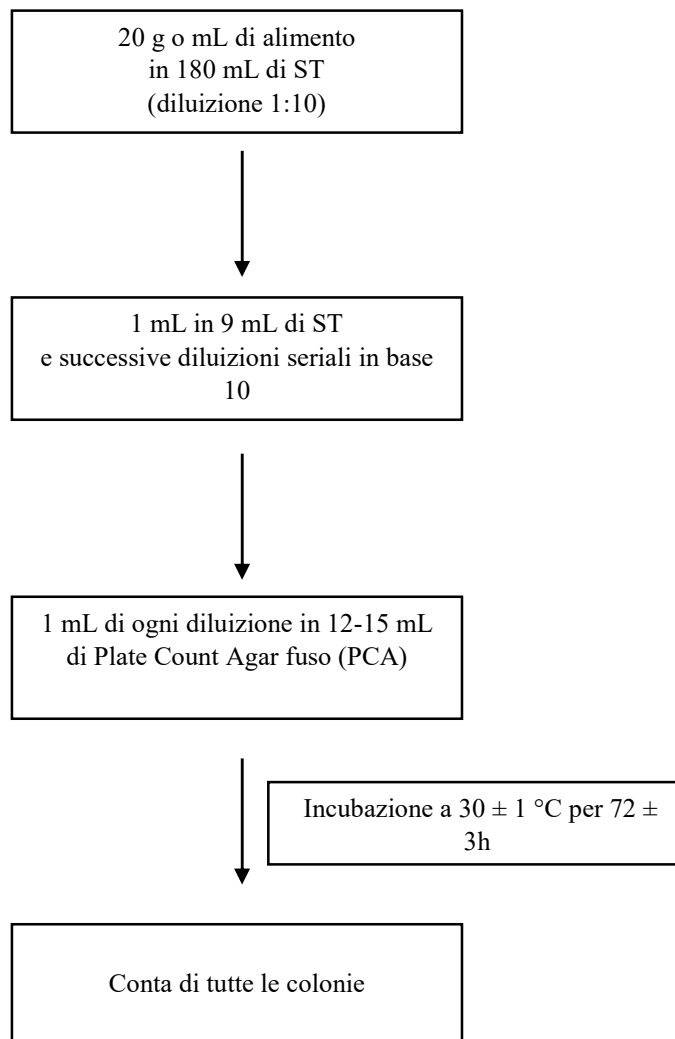


Tabella 9: Fasi per la conta dei microrganismi mesofili a 30°C.

Al termine del periodo di incubazione, la conta dei microrganismi mesofili è stata eseguita contando tutte le colonie presenti in due diluizioni successive; le piastre non dovevano contenere più di 300 colonie e una doveva averne almeno 10 (Figura 14).



Figura 14: Microrganismi mesofili su terreno PCA.

4.6.4 Analisi quantitativa dei batteri lattici a 30°C (Metodo interno IZSVe)

La conta dei batteri lattici a 30°C è stata eseguita sia nei campioni non inoculati sia in quelli contaminati con *L. monocytogenes*.

La quantificazione dei batteri lattici è un parametro importante in quanto essi competono con *L. monocytogenes* per l'utilizzo delle sostanze nutritive, e possono inibire il suo sviluppo producendo batteriocine. L'analisi ha consentito, anche in questo caso, di monitorare la microflora associata al prodotto.

La procedura di riferimento consiste in un metodo sviluppato internamente all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Tabella 10).

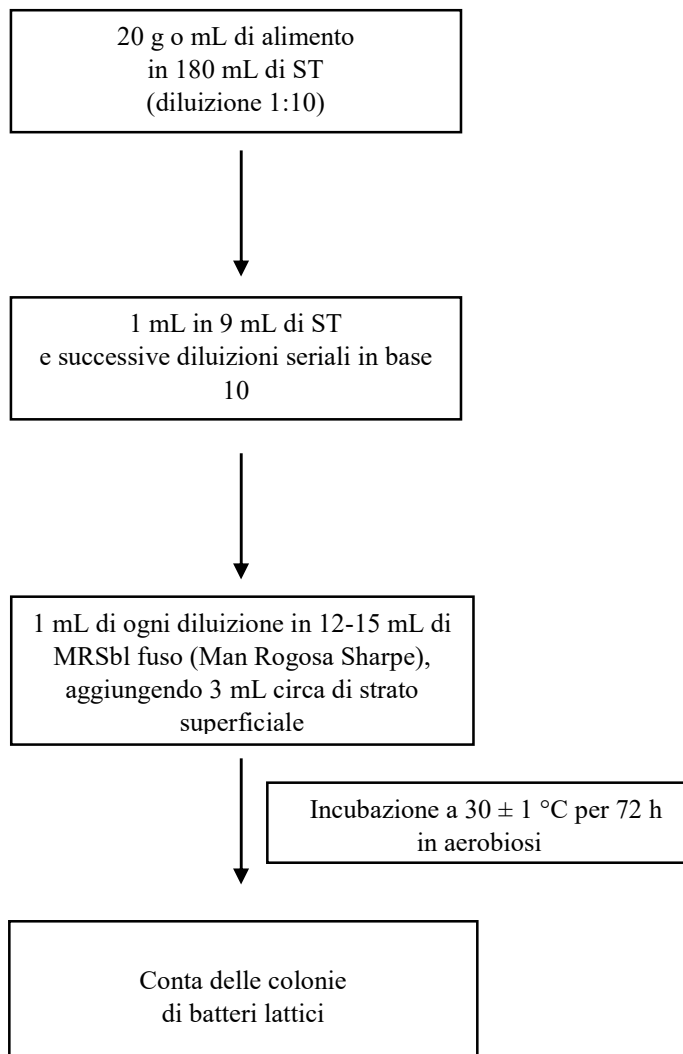


Tabella 10: Fasi per la conta dei batteri lattici a 30°C.

Al termine del periodo di incubazione, la conta dei batteri lattici è stata eseguita contando le colonie presenti in due diluizioni successive, a patto che queste non superassero le 300 colonie e ne presentassero almeno 10. Le colonie dei batteri lattici appaiono nelle piastre di MRSbl come compatte o con aspetto piumoso, di piccole dimensioni, opache e bianche (Figura 15).



Figura 15: Batteri lattici su terreno MRSbl.

4.7 Analisi chimico-fisiche

Sia per i campioni non inoculati sia per quelli contaminati sono stati misurati pH e a_w , per la valutazione delle caratteristiche chimico-fisiche intrinseche del prodotto.

Per la misurazione del pH, è stata prelevata un'aliquota del campione, la quale è stata omogenizzata e miscelata con acqua distillata, in accordo a quanto previsto dal metodo di riferimento MFHPB-03:2014.

L'attività dell'acqua a_w è stata misurata seguendo la norma ISO 18787:2017; il campione è stato sottoposto alla misurazione senza ulteriori trattamenti.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Insalata di mare e legumi

Le tabelle 11, 12 e 13 riassumono i risultati relativi ai campioni non inoculati dei tre lotti dell'insalata di mare e legumi. L'analisi dei microrganismi mesofili, dei batteri lattici e delle caratteristiche chimico-fisiche sono state eseguite in pool di tre unità campionarie, mentre la ricerca di *L. monocytogenes* in triplicato. I campioni alimentari sono stati tenuti ad una temperatura di + 8°C per l'intera durata del challenge test.

I valori medi di pH e a_w nel lotto 1 (pH = 5,0; a_w = 0,98), nel lotto 2 (pH = 5,1; a_w = 0,975) e nel lotto 3 (pH = 5,05; a_w = 0,985), misurati nei controlli negativi ad inizio e fine vita, sarebbero tali da classificare l'insalata di mare e legumi come alimento in grado di favorire la crescita di *L. monocytogenes*, per il quale quindi il limite di legge da rispettare è l'assenza del microrganismo in 25 grammi in 5 unità campionarie.

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Microrganismi mesofili a 30°C UFC/g	Batteri lattici a 30°C UFC/g	pH	a_w	Repliche	<i>L. monocytogenes</i> PCR	<i>L. monocytogenes</i> UFC/g
0	/	3.600	< 10	4,9	0,98	1	presente	< 10
						2	presente	< 10
						3	presente	< 10
12	+ 8°C	29.000	15.000	5,1	0,98	1	presente	< 10
						2	presente	< 10
						3	presente	< 10

Tabella 11: Campioni non contaminati artificialmente, lotto 1-insalata di mare e legumi.

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Microrganismi mesofili a 30°C UFC/g	Batteri lattici a 30°C UFC/g	pH	a_w	Repliche	<i>L. monocytogenes</i> PCR
0	/	12.000	40	5,1	0,97	1	assente
						2	assente
						3	assente
12	+ 8°C	870.000	960.000	5,1	0,98	1	assente
						2	assente
						3	assente

Tabella 12: Campioni non contaminati artificialmente, lotto 2-insalata di mare e legumi.

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Microrganismi mesofili a 30°C UFC/g	Batteri lattici a 30°C UFC/g	pH	a _w	Repliche	<i>L. monocytogenes</i> PCR
0	/	68.000	< 40	5,1	0,99	1	assente
						2	assente
						3	assente
12	+ 8°C	2.100.000	1.000.000	5,0	0,98	1	assente
						2	assente
						3	assente

Tabella 13: Campioni non contaminati artificialmente, lotto 3-insalata di mare e legumi.

L'analisi molecolare dei campioni non inoculati del lotto 1 dell'insalata di mare e legumi ha rilevato la presenza di *L. monocytogenes* sia all'inizio sia alla fine della shelf-life del prodotto, indice di una naturale contaminazione della matrice alimentare. Nonostante ciò la carica del microrganismo è risultata inferiore a 10 UFC/g, che rappresenta il limite di rilevabilità del metodo analitico e di conseguenza, la bassa carica non ha interferito con i risultati del challenge test. Alla fine della shelf-life la carica misurata è rimasta invariata, sempre al di sotto del limite di rilevabilità.

I campioni non inoculati del lotto 2 e 3 sono risultati negativi alla ricerca di *L. monocytogenes* tramite Real Time PCR, dimostrando in questo caso l'assenza di contaminazione naturale.

I risultati relativi ai campioni contaminati artificialmente nei tre lotti dell'insalata di mare e legumi sono riassunti nelle tabelle 14, 15 e 16, nelle quali viene riportata la dinamica di crescita di *L. monocytogenes*, valutata in triplicato, al fine di tenere in considerazione anche la variabilità legata alla distribuzione del patogeno nel prodotto.

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Microrganismi mesofili a 30°C UFC/g	Batteri lattici a 30°C UFC/g	pH	a _w	Repliche	Conta di <i>L. monocytogenes</i> UFC/g
0	/	720	< 10	5,0	0,97	1	120
						2	220
						3	170
12	+ 8°C	20.000	16.000	5,1	0,98	1	70
						2	100
						3	70
14	+ 8°C	85.000	45.000	5,1	0,97	1	100
						2	110
						3	130

Tabella 14: Campioni inoculati, lotto 1-insalata di mare e legumi.

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Microrganismi mesofili a 30°C UFC/g	Batteri lattici a 30°C UFC/g	pH	a _w	Repliche	Conta di <i>L. monocytogenes</i> UFC/g
0	/	13.000	< 40	5,0	0,98	1	80
						2	150
						3	100
5	+ 8°C	13.000	150	5,0	0,98	1	70
						2	30
						3	50
8	+ 8°C	43.000	7.100	5,0	0,97	1	120
						2	140
						3	30
12	+ 8°C	580.000	490.000	5,1	0,98	1	50
						2	90
						3	70
14	+ 8°C	25.000.000	25.000.000	5,2	0,99	1	50
						2	40
						3	60

Tabella 15: Campioni inoculati, lotto 2-insalata di mare e legumi.

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Microrganismi mesofili a 30°C UFC/g	Batteri lattici a 30°C UFC/g	pH	a _w	Repliche	Conta di <i>L. monocytogenes</i> UFC/g
0	/	22.000	< 10	5,1	0,99	1	60
						2	70
						3	50
5	+ 8°C	24.000	120	5,2	0,99	1	90
						2	80
						3	40
8	+ 8°C	56.000	8.600	5,0	0,99	1	120
						2	100
						3	110
12	+ 8°C	170.000	86.000	5,0	0,99	1	40
						2	60
						3	60
14	+ 8°C	47.000.000	960.000	5,1	0,99	1	80
						2	30
						3	60

Tabella 16: Campioni inoculati, lotto 3-insalata di mare e legumi.

Per la valutazione delle caratteristiche chimico-fisiche sono stati misurati pH e a_w in pool di tre unità campionarie sia nei campioni non inoculati sia in quelli contaminati. L'analisi di questi parametri nei campioni non inoculati è fondamentale per stabilire se la contaminazione artificiale di *L. monocytogenes* nei campioni è responsabile dell'alterazione delle caratteristiche intrinseche dell'alimento. In tutti e tre i lotti il confronto dei valori di pH e a_w non mostra particolari differenze, indice di come l'inoculo non abbia interferito con le caratteristiche chimico-fisiche del prodotto stesso.

L'analisi quantitativa dei microrganismi mesofili a 30°C e dei batteri lattici a 30°C viene eseguita sia nei campioni non inoculati sia in quelli contaminati, con lo scopo di valutare la microflora naturale associata all'alimento, che può interferire con lo sviluppo di *L. monocytogenes*, limitandone la crescita. I batteri lattici rappresentano gran parte della microflora associata alle insalate di mare e prodotti affini ed è noto infatti che la loro presenza può limitare la proliferazione dei microrganismi patogeni, compresa *L. monocytogenes* (Andrighetto *et al.*, 2009). Essi sono in grado di produrre sostanze antagoniste, come batteriocine e sfruttano meccanismi di esclusione competitiva per ridurre lo sviluppo dei patogeni. Di conseguenza l'analisi quantitativa di tali microrganismi è essenziale per l'interpretazione dei risultati del challenge test.

Nei campioni inoculati si può osservare come la concentrazione dei batteri lattici sia particolarmente bassa nei primi giorni della shelf-life del prodotto alimentare, aumentando poi con il trascorrere dei giorni. Nella fase finale della prova (dodicesimo e quattordicesimo giorno) l'incremento nel numero

dei batteri lattici è accompagnato da un conseguente calo nella concentrazione di *L. monocytogenes*, confermato nella maggior parte delle repliche analizzate dei tre lotti.

L'analisi quantitativa di *L. monocytogenes* nei campioni contaminati artificialmente (Tabelle 14, 15, 16) ha evidenziato delle differenze nelle repliche analizzate nella stessa sessione di lavoro nello stesso lotto: tale variabilità è legata alla distribuzione non omogenea del microrganismo nell'alimento e all'incertezza di misura del metodo analitico.

Per ogni lotto sono state analizzate le brodocolture dei ceppi EURL e di campo, utilizzate per la contaminazione artificiale dei campioni, conservate alla stessa temperatura (+ 8°C) e testate contemporaneamente ai prodotti alimentari (Tabelle 17, 18, 19).

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Ceppo EURL		Ceppo di campo	
		UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL	UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL
0	/	90	1,95	120	2,08
12	+ 8°C	540.000.000	8,73	430.000.000	8,63
14	+ 8°C	110.000.000	8,04	79.000.000	7,90

Tabella 17: Dinamica di crescita di *L. monocytogenes* nelle brodocolture, lotto 1-insalata di mare e legumi.

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Ceppo EURL		Ceppo di campo	
		UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL	UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL
0	/	87	1,94	110	2,04
5	+ 8°C	1.800.000	6,26	2.200.000	6,34
8	+ 8°C	450.000.000	8,65	870.000.000	8,94
12	+ 8°C	1.200.000.000	9,08	1.200.000.000	9,08
14	+ 8°C	1.600.000.000	9,20	3.500.000.000	9,54

Tabella 18: Dinamica di crescita di *L. monocytogenes* nelle brodocolture, lotto 2-insalata di mare e legumi.

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Ceppo EURL		Ceppo di campo	
		UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL	UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL
0	/	110	2,04	70	1,85
5	+ 8°C	1.000.000	6,00	2.200.000	6,34
8	+ 8°C	2.600.000.000	9,41	1.300.000.000	9,11
12	+ 8°C	380.000.000	8,58	230.000.000	8,36
14	+ 8°C	1.200.000.000	9,08	690.000.000	8,84

Tabella 19: Dinamica di crescita di *L. monocytogenes* nelle brodoculture, lotto 3-insalata di mare e legumi.

Lo scopo di tali analisi, indicate come challenge test *in vitro* o di controllo, è quello di valutare la vitalità di entrambi i ceppi batterici utilizzati per la contaminazione; in questo modo è possibile stabilire se sono le condizioni di conservazione a limitare la crescita del microrganismo oppure è l'alimento stesso ad essere la causa del suo ridotto sviluppo.

Per i ceppi EURL e di campo è stata eseguita l'analisi quantitativa di *L. monocytogenes* mediante la stessa procedura adottata per l'analisi dei campioni alimentari.

Come si evince dalle tabelle 17, 18 e 19 la crescita di *L. monocytogenes* non è stata influenzata negativamente dalla temperatura di conservazione e di conseguenza il ridotto sviluppo del microrganismo nei campioni contaminati (Tabelle 20, 21, 22) rispetto alle relative brodoculture è da attribuire alla stessa matrice alimentare.

Per la determinazione del potenziale di crescita (δ) sono state seguite le linee guida europee dell'EURL *Lm*, secondo le quali il potenziale di crescita di *L. monocytogenes* viene calcolato come la differenza tra la mediana dei log₁₀ della concentrazione in UFC/g alla fine del challenge test e la mediana dei log₁₀ della concentrazione in UFC/g all'inizio della prova, dove per mediana si intende il valore intermedio dei logaritmi misurati nelle tre repliche.

Le tabelle 20, 21, 22 riassumono le conte di *L. monocytogenes*, le mediane e il potenziale di crescita per i tre diversi lotti dell'insalata di mare e legumi.

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Repliche	LM UFC/g	LM log ₁₀ UFC/g	LM mediana (log ₁₀ UFC/g)	Differenza mediane rispetto al giorno 0	Potenziale di crescita (δ)
0	/	1	120	2,08	2,23	/	-0,19
		2	220	2,34			
		3	170	2,23			
12	+ 8°C	1	70	1,85	1,85	-0,38	
		2	100	2,00			
		3	70	1,85			
14	+ 8°C	1	100	2,00	2,04	-0,19	
		2	110	2,04			
		3	130	2,11			

Tabella 20: Potenziale di crescita relativo al lotto 1-insalta di mare e legumi.

In grassetto sono evidenziate le mediane; LM = *L. monocytogenes*.

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Repliche	LM UFC/g	LM log ₁₀ UFC/g	LM mediana (log ₁₀ UFC/g)	Differenza mediane rispetto al giorno 0	Potenziale di crescita (δ)
0	/	1	80	1,90	2,00	/	0,08
		2	150	2,18			
		3	100	2,00			
5	+ 8°C	1	70	1,85	1,70	-0,30	
		2	30	1,48			
		3	50	1,70			
8	+ 8°C	1	120	2,08	2,08	0,08	
		2	140	2,15			
		3	30	1,48			
12	+ 8°C	1	50	1,70	1,85	-0,15	
		2	90	1,95			
		3	70	1,85			
14	+ 8°C	1	50	1,70	1,70	-0,30	
		2	40	1,60			
		3	60	1,78			

Tabella 21: Potenziale di crescita relativo al lotto 2-insalta di mare e legumi.

In grassetto sono evidenziate le mediane; LM = *L. monocytogenes*.

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Repliche	LM UFC/g	LM log ₁₀ UFC/g	LM mediana (log ₁₀ UFC/g)	Differenza mediane rispetto al giorno 0	Potenziale di crescita (δ)
0	/	1	60	1,78	1,78	/	0,26
		2	70	1,85			
		3	50	1,70			
5	+ 8°C	1	90	1,95	1,90	0,12	
		2	80	1,90			
		3	40	1,60			
8	+ 8°C	1	120	2,08	2,04	0,26	
		2	100	2,00			
		3	110	2,04			
12	+ 8°C	1	40	1,60	1,78	0,00	
		2	60	1,78			
		3	60	1,78			
14	+ 8°C	1	80	1,90	1,78	0,00	
		2	30	1,48			
		3	60	1,78			

Tabella 22: Potenziale di crescita relativo al lotto 3-insalata di mare e legumi.

In grassetto sono evidenziate le mediane; LM = *L. monocytogenes*.

Per valutare l'accettabilità del challenge test si calcola la deviazione standard tra i log₁₀ della concentrazione in UFC/g del microrganismo nelle tre repliche al giorno 0 (giorno della contaminazione artificiale dell'alimento), per ogni lotto. Secondo quanto riportato dalle linee guida dell'EURL *Lm*, la deviazione standard, dovuta all'incertezza di misura e all'eterogeneità della contaminazione, deve essere $\leq 0,5 \log_{10} \text{ UFC/g}$ affinché il challenge test possa essere considerato valido.

In tutti e tre i lotti dell'insalata di mare e legumi si è osservato un valore di deviazione standard $\leq 0,5 \log_{10} \text{ UFC/g}$, confermando la validità dei risultati ottenuti (Tabella 23).

Lotto	Giorno di vita	Repliche	LM UFC/g	LM log10 UFC/g	Deviazione standard UFC/g
1	0	1	120	2,08	0,13
		2	220	2,34	
		3	170	2,23	
2	0	1	80	1,90	0,14
		2	150	2,18	
		3	100	2,00	
3	0	1	60	1,78	0,07
		2	70	1,85	
		3	50	1,70	

Tabella 23: Calcolo della deviazione standard nei tre lotti dell'insalata di mare e legumi (LM = *L. monocytogenes*).

Il potenziale di crescita di *L. monocytogenes* all'intero di ogni singolo lotto corrisponde alla differenza tra le mediane più sfavorevole; dunque per il lotto 1 δ è $-0,19 \log_{10}$ UFC/g, per il lotto 2 corrisponde a $0,08 \log_{10}$ UFC/g e per il lotto 3 è $0,26 \log_{10}$ UFC/g. Come previsto dalle linee guida dell'EURL *Lm*, il potenziale di crescita (δ) dell'insalata di mare e legumi è il valore più alto e quindi più sfavorevole individuato dall'analisi dei tre lotti, cioè corrisponde a $0,26 \log_{10}$ UFC/g.

Poiché δ risulta $\leq 0,5 \log_{10}$ UFC/g, l'insalata di mare e legumi analizzata nei tre diversi lotti non ha supportato la crescita di *L. monocytogenes* per l'intera durata della prova, nonostante sia stata conservata ad una temperatura di abuso termico di $+ 8^{\circ}\text{C}$. Il limite di legge da rispettare per questo prodotto è dunque di 100 UFC/g, come previsto dal Reg. CE 2073/2005.

5.2 Carpaccio di seppia

I campioni appartenenti al lotto del carpaccio di seppia sono stati tenuti per i due terzi della loro vita commerciale a $+ 7^{\circ}\text{C}$, poi a $+ 12^{\circ}\text{C}$ sino alla fine della prova.

I valori medi di pH (5,4) e a_w (0,985), misurati nei controlli negativi ad inizio e fine vita, sarebbero tali da classificare il carpaccio di seppia come terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*, per il quale quindi il limite di legge da rispettare è l'assenza del microrganismo in 25 grammi in 5 unità campionarie.

I campioni non inoculati sono risultati negativi per la presenza di *L. monocytogenes* mediante Real Time PCR, escludendo quindi la contaminazione naturale della matrice alimentare (Tabella 24).

Come nel caso dell'insalata di mare e legumi, anche per il carpaccio di seppia le caratteristiche chimico-fisiche si sono mantenute pressoché invariate nei campioni non inoculati e in quelli contaminati, potendo affermare quindi che l'inoculo non ha alterato le caratteristiche intrinseche dei prodotti artificialmente contaminati con il microrganismo.

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Microrganismi mesofili a 30°C UFC/g	Batteri lattici a 30°C UFC/g	pH	a _w	Repliche	<i>L. monocytogenes</i> PCR
0	/	410	< 10	5,4	0,98	1	assente
						2	assente
						3	assente
12	+ 7/12 °C	330	90	5,4	0,99	1	assente
						2	assente
						3	assente

Tabella 24: Campioni non contaminati artificialmente, lotto 1-carpaccio di seppia.

La tabella 25 riassume i risultati ottenuti dalle analisi eseguite sui campioni contaminati artificialmente, riportando anche le conte di *L. monocytogenes*, indispensabili per il successivo calcolo del potenziale di crescita.

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Microrganismi mesofili a 30°C UFC/g	Batteri lattici a 30°C UFC/g	pH	a _w	Repliche	Conta di <i>L. monocytogenes</i> UFC/g
0	/	1.200	< 10	5,5	0,98	1	70
						2	80
						3	110
5	+ 7°C	710	< 10	5,5	0,98	1	140
						2	170
						3	80
8	+ 7°C	1.200	< 40	5,5	0,98	1	150
						2	100
						3	110
12	+ 12°C	1.500	< 40	5,4	0,98	1	80
						2	120
						3	130
14	+ 12°C	7.200	5.700	5,4	0,99	1	230
						2	160
						3	190

Tabella 25: Campioni inoculati lotto 1-carpaccio di seppia.

Analizzando le conte di *L. monocytogenes* nelle diverse repliche allo stesso giorno di analisi è stato possibile osservare una certa variabilità, dovuta all'incertezza di misura del metodo analitico e alla distribuzione non omogenea del microrganismo nei campioni.

Anche per il carpaccio di seppia è stata valutata la vitalità dei ceppi EURL e di campo, utilizzati per la contaminazione artificiale dei campioni alimentari e conservati alle medesime temperature (Tabella 26). È stato confermato che la ridotta crescita di *L. monocytogenes* nel prodotto è dovuta alla matrice alimentare e non alle temperature di conservazione.

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Ceppo EURL		Ceppo di campo	
		UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL	UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL
0	/	65	1,81	83	1,92
5	+ 7°C	340.000	5,53	190.000	5,28
8	+ 7°C	95.000.000	7,98	150.000.000	8,18
12	+ 12°C	1.000.000.000	9,00	1.200.000.000	9,08
14	+ 12°C	640.000.000	8,81	460.000.000	8,66

Tabella 26: Dinamica di crescita di *L. monocytogenes* nelle brodocolture, lotto 1-carpaccio di seppia.

Dall'analisi quantitativa di *L. monocytogenes* si è potuto calcolare il potenziale di crescita δ , grazie alla determinazione delle mediane dei \log_{10} delle concentrazioni nei diversi giorni di vita del prodotto (Tabella 27).

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Repliche	LM UFC/g	LM \log_{10} UFC/g	LM mediana (\log_{10} UFC/g)	Differenza mediane rispetto al giorno 0	Potenziale di crescita (δ)
0	/	1	70	1,85	1,90	/	0,38
		2	80	1,90			
		3	110	2,04			
5	+ 7°C	1	140	2,15	2,15	0,25	
		2	170	2,23			
		3	80	1,90			
8	+ 7°C	1	150	2,18	2,04	0,14	
		2	100	2,00			
		3	110	2,04			
12	+ 12°C	1	80	1,90	2,08	0,18	
		2	120	2,08			
		3	130	2,11			
14	+ 12°C	1	230	2,36	2,28	0,38	
		2	160	2,20			
		3	190	2,28			

Tabella 27: Potenziale di crescita relativo al lotto 1-carpaccio di seppia.

In grassetto sono evidenziate le mediane; LM = *L. monocytogenes*.

Il calcolo del potenziale di crescita δ di *L. monocytogenes* nel carpaccio di seppia ha dato come risultato un valore pari a 0,38 \log_{10} UFC/g ($\leq 0,5 \log_{10}$ UFC/g), individuato come valore più sfavorevole tra le repliche analizzate nei diversi giorni di vita. Di conseguenza l'alimento, nel caso del lotto testato, non ha supportato la crescita del microrganismo durante il periodo di monitoraggio e pertanto andrebbe applicato il limite di tolleranza di 100 UFC/g, imposto dal Reg. CE 2073/2005. Per determinare l'accettabilità del challenge test è stata calcolata la deviazione standard dei \log_{10} della concentrazione in UFC/g del microrganismo nelle tre repliche analizzate al giorno 0 (Tabella 28).

Essendo $\leq 0,5 \log_{10}$ UFC/g, i risultati ottenuti possono essere considerati validi, come previsto dalle linee guida dell'EURL *Lm*.

Lotto	Giorno di vita	Repliche	LM UFC/g	LM log ₁₀ UFC/g	Deviazione standard UFC/g
1	0	1	70	1,85	0,10
		2	80	1,90	
		3	110	2,04	

Tabella 28: Calcolo della deviazione standard, lotto 1-carpaccio di seppia
(LM = *L. monocytogenes*).

Secondo le linee guida europee il potenziale di crescita δ di *L. monocytogenes* deve essere valutato in almeno tre lotti di prodotto per garantire la ripetibilità dei risultati, dunque per il carpaccio di seppia è necessario estendere l'analisi ad altri due lotti.

L'analisi di più lotti è importante soprattutto per i prodotti della pesca: il mare è un ambiente particolarmente variabile e tale variabilità si riscontra anche nel pescato, che può presentare differenze, ad esempio, in base alla stagione di pesca.

5.3 Salmone in insalata con olive verdi

I campioni alimentari sono stati tenuti per i due terzi della loro vita commerciale a + 7°C, poi a + 12°C fino al termine del challenge test.

I valori medi di pH (5,56) e a_w (0,99) relativi ai controlli negativi ad inizio e fine vita, sarebbero tali da classificare il salmone in insalata con olive verdi come alimento in grado di favorire la crescita di *L. monocytogenes*, per il quale quindi il limite di legge da rispettare è l'assenza del microrganismo in 25 grammi in 5 unità campionarie.

L'analisi dei campioni negativi di controllo ha consentito di verificare l'assenza di contaminazione naturale da *L. monocytogenes* e l'assenza di modificazioni delle proprietà intrinseche dell'alimento a seguito dell'inoculo (Tabella 29 e 30).

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Microrganismi mesofili a 30°C UFC/g	Batteri lattici a 30°C UFC/g	pH	a _w	Repliche	<i>L. monocytogenes</i> PCR
0	/	3.500.000	23.000	5,7	0,99	1	assente
						2	assente
						3	assente
6	+ 7/12 °C	58.000.000	49.000.000	5,6	0,99	1	assente
						2	assente
						3	assente
8	+ 7/12 °C	120.000.000	120.000.000	5,4	0,99	1	assente
						2	assente
						3	assente

Tabella 29: Campioni non contaminati artificialmente, lotto 1-salmone in insalata con olive verdi.

Le conte di *L. monocytogenes* nei campioni inoculati (Tabella 30) sono risultate particolarmente elevate a fine shelf-life (giorno 6) e all'ottavo giorno, quando i campioni sono stati spostati alla temperatura di abuso termico di + 12°C, dimostrando l'effettiva capacità dell'alimento di favorire la crescita del microrganismo e preannunciando un potenziale di crescita alto. A queste condizioni di conservazione anche i microrganismi mesofili e i batteri lattici sono aumentati notevolmente.

Data la distribuzione non perfettamente omogenea dell'inoculo e l'incertezza di misura del metodo analitico, si possono osservare delle differenze più o meno marcate tra le conte di *L. monocytogenes* all'interno delle singole sessioni di lavoro.

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Microrganismi mesofili a 30°C UFC/g	Batteri lattici a 30°C UFC/g	pH	a _w	Repliche	Conta di <i>L. monocytogenes</i> UFC/g
0	/	9.400.000	74.000	5,5	0,99	1	140
						2	130
						3	160
4	+ 7°C	26.000.000	28.000.000	5,4	0,99	1	210
						2	250
						3	150
6	+ 12°C	100.000.000	93.000.000	5,3	0,99	1	360
						2	630
						3	490
8	+ 12°C	820.000.000	560.000.000	5,3	0,99	1	1.500
						2	1.300
						3	730

Tabella 30: Campioni inoculati lotto 1-salmone in insalata con olive verdi.

La dinamica di crescita di *L. monocytogenes* nelle brodocolture di controllo è stata analizzata sia per il ceppo EURL sia per quello di campo (Tabella 31), con lo scopo di valutare la vitalità dei ceppi batterici utilizzati per il challenge test. La crescita del microrganismo non è risultata essere inibita dalle diverse temperature di conservazione, dunque sono le caratteristiche intrinseche dell'alimento ad essere responsabili del ridotto sviluppo di *L. monocytogenes* nei campioni alimentari rispetto alle brodocolture di controllo.

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Ceppo EURL		Ceppo di campo	
		UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL	UFC/mL	log ₁₀ UFC/mL
0	/	85	1,93	100	2,00
4	+ 7°C	260.000	5,41	260.000	5,41
6	+ 12°C	310.000.000	8,49	200.000.000	8,30
8	+ 12°C	1.100.000.000	9,04	960.000.000	8,98

Tabella 31: Dinamica di crescita di *L. monocytogenes* nelle brodocolture, lotto 1-salmone in insalata con olive verdi.

Il calcolo del potenziale di crescita δ ha dato un risultato di 0,96 UFC/g (Tabella 32): essendo $>$ di 0,5 log₁₀ UFC/g, il prodotto è da collocare nella categoria degli alimenti che supportano la crescita di *L. monocytogenes*. Non è quindi possibile applicare il limite di tolleranza di 100 UFC/g, dunque il Regolamento CE 2073/2005 impone l'assenza del microrganismo in 25 grammi in 5 unità campionarie.

Il salmone dunque si conferma essere un prodotto ittico che frequentemente favorisce la crescita di *L. monocytogenes*, come riportato in diversi lavori scientifici (Hoffman *et al.*, 2003; Uyttendaele *et al.*, 2009; Gambarin *et al.*, 2012).

Giorni di vita	Temperatura di conservazione	Repliche	LM UFC/g	LM log ₁₀ UFC/g	LM mediana (log ₁₀ UFC/g)	Differenza mediane rispetto al giorno 0	Potenziale di crescita (δ)
0	/	1	140	2,15	2,15	/	0,96
		2	130	2,11			
		3	160	2,20			
4	+ 7°C	1	210	2,32	2,32	0,17	
		2	250	2,40			
		3	150	2,18			
6	+ 12°C	1	360	2,56	2,69	0,54	
		2	630	2,80			
		3	490	2,69			
8	+ 12°C	1	1.500	3,18	3,11	0,96	
		2	1.300	3,11			
		3	730	2,86			

Tabella 32: Potenziale di crescita relativo al lotto 1-salmone in insalata con olive verdi.

In grassetto sono evidenziate le mediane; LM = *L. monocytogenes*.

La deviazione standard calcolata tra i log₁₀ delle concentrazioni del microrganismo in UFC/g al giorno 0 è risultata minore di 0,5 log₁₀ UFC/g, confermando la validità dei risultati ottenuti (Tabella 33).

Lotto	Giorno di vita	Repliche	LM UFC/g	LM log ₁₀ UFC/g	Deviazione standard UFC/g
1	0	1	140	2,15	0,05
		2	130	2,11	
		3	160	2,20	

Tabella 33: Calcolo della deviazione standard, lotto 1- salmone in insalata con olive verdi

(LM = *L. monocytogenes*).

È stato analizzato un unico lotto di salmone in insalata con olive verdi in quanto il potenziale di crescita δ di *L. monocytogenes* calcolato risulta essere particolarmente alto (0,96 UFC/g) e poiché le linee guida dell'EURL *Lm* prevedono di considerare come potenziale di crescita δ il valore più

sfavorevole tra i tre lotti analizzati, il risultato finale sarebbe comunque stato al di sopra del valore di riferimento $0,5 \log_{10}$ UFC/g, anche se gli altri due lotti avrebbero dato risultati migliori.

6. CONCLUSIONI

Sulla base delle loro caratteristiche chimico-fisiche (pH e a_w) le tre matrici alimentari oggetto di studio verrebbero classificate come alimenti in grado di favorire la crescita del patogeno, per i quali dunque il limite di legge da rispettare è l'assenza del microrganismo in 25 grammi in 5 unità campionarie.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare il potenziale di crescita (δ) di *L. monocytogenes* e confrontarlo con il valore di riferimento di 0,5 log₁₀ UFC/g come riportato nelle linee guida dell'EURL *Lm*; a tale scopo il patogeno è stato inoculato nei prodotti e ne è stata determinata la curva di crescita durante l'intera shelf-life.

Il potenziale di crescita di *L. monocytogenes* calcolato nell'insalata di mare e legumi e nel carpaccio di seppia è risultato rispettivamente pari a 0,26 log₁₀ UFC/g e 0,38 log₁₀ UFC/g, dimostrando l'incapacità di tali prodotti alimentari di supportare la crescita del microrganismo. Il limite di legge da rispettare per questi due prodotti è dunque di 100 UFC/g.

Il challenge test condotto per il salmone in insalata con olive verdi ha dato come risultato un valore del potenziale di crescita di *L. monocytogenes* pari a 0,96 log₁₀ UFC/g. Poiché δ è maggiore di 0,5 log₁₀ UFC/g, l'alimento si conferma essere terreno favorevole allo sviluppo del patogeno e il limite imposto dalla normativa vigente per la commercializzazione è l'assenza del microrganismo in 25 grammi in 5 unità campionarie. Di fronte a questo risultato, l'OSA può intervenire cambiando la ricetta del prodotto, ad esempio modificando l'acidità dello stesso, oppure assegnando una shelf-life più breve, facendola terminare il giorno in cui la crescita del microrganismo è ancora ad un valore accettabile.

Oltre all'utilizzo dei challenge test, il Reg. CE 2073/2005 mette a disposizione dell'OSA altri metodi per la valutazione della curva di crescita di *L. monocytogenes* nei prodotti alimentari, come l'utilizzo della microbiologia predittiva e la possibilità di consultare la bibliografia disponibile.

La consultazione della letteratura scientifica per studiare le caratteristiche di crescita e sviluppo di *L. monocytogenes* è mirata a individuare studi condotti su prodotti alimentari simili, sia per caratteristiche intrinseche sia per processo produttivo, all'alimento oggetto di studio, con lo scopo di estendere tali risultati al proprio prodotto. Ciò prevede dunque un lento e minuzioso lavoro di ricerca bibliografica.

La microbiologia predittiva si basa, invece, sull'utilizzo di modelli matematici, che consentano di predire il comportamento dei microrganismi in un determinato substrato, conservato a specifiche condizioni ambientali. Il limite di questo sistema è legato alla necessità di confrontare i risultati teorici

con quelli ottenuti nella realtà, al fine di validare il modello matematico usato (Petruzzelli, 2016). Inoltre la microbiologia predittiva non tiene in considerazione l'interazione del microrganismo, oggetto di studio, con la microflora associata all'alimento, la quale può interferire con la crescita del microrganismo target.

Il challenge test costituisce spesso la soluzione scelta dall'OSA rispetto ai precedenti sistemi, per la valutazione del potenziale di crescita perché consiste in una vera e propria prova di laboratorio in cui il microrganismo target viene inoculato artificialmente nella matrice alimentare, la quale viene poi conservata alle condizioni ragionevolmente prevedibili di trasporto, distribuzione e stoccaggio. Ciò consente di studiare la dinamica di comportamento del microrganismo nell'alimento, come se quest'ultimo fosse destinato alla normale commercializzazione, tenendo conto di tutti quei fattori che possono interferire con la sua crescita, come l'interazione con la microflora associata all'alimento, le caratteristiche chimico-fisiche dello stesso e le diverse temperature di conservazione. Il limite del challenge test è legato al fatto che i risultati riguardanti il potenziale di crescita sono riconducibili solo a quel determinato prodotto alimentare, conservato a quelle temperature, dunque qualsiasi cambiamento nel processo produttivo o nelle modalità di conservazione comportano la necessità di ripetere lo studio.

Inoltre il challenge test fornisce altri dati che possono essere utili all'azienda produttrice: per esempio l'analisi dei controlli negativi (campioni non inoculati) può rilevare l'eventuale presenza di *L. monocytogenes* e conseguentemente l'azienda produttrice può valutare di cambiare fornitore, se la presenza del microrganismo è da attribuire alla materia prima, oppure migliorare le procedure di lavorazione o di sanificazione degli ambienti, per eliminare l'eventuale possibilità di cross-contaminazioni.

Ad oggi il challenge test è quindi considerato uno strumento fondamentale con cui l'OSA può valutare la crescita di *L. monocytogenes* nei prodotti alimentari, con lo scopo di immettere sul mercato alimenti conformi alla normativa vigente e che non costituiscano un pericolo per la salute dei consumatori. È proprio il Reg. CE 178/2002 a sottolineare come la libera circolazione di alimenti sicuri e sani sia un aspetto fondamentale del mercato interno e contribuisca “in maniera significativa alla salute e al benessere dei cittadini, nonché ai loro interessi sociali ed economici”.

BIBLIOGRAFIA

- Aalto-Araneda, M., Lunden, J., Markkula, A., Hakola, S., Korkeala, H., 2019. Processing plant and machinery sanitation and hygiene practices associate with *Listeria monocytogenes* occurrence in ready-to-eat fish products. *Food Microbiology*, 82, 455-464.
- Abdollahzadeh, E., Ojagh, S.M., Hosseini, H., Irajian, G., Ghaemi, E.A., 2016. Prevalence and molecular characterization of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* isolated from fish, shrimp, and cooked ready-to-eat (RTE) aquatic products in Iran. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 205-211.
- Abram, F., Starr, E., Karatzas, K.A.G., Matlawska-Wasowska, K., Boyd, A., Wiedmann, M., Boor, K.J., Connally, D., O'Byrne, C.P., 2008. Identification of Components of the Sigma B Regulon in *Listeria monocytogenes* That Contribute to Acid and Salt Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(22), 6848-6858.
- Andrighetto, C., Lombardi, A., Ferrati, M., Guidi, A., Corrain, C., Arcangeli, G., 2009. Lactic acid bacteria biodiversity in Italian marinated seafood salad and their interactions on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 20, 462-468.
- Becattini, S., Littmann, E.R., Carter, R.A., Kim, S.G., Morjaria, S.M., Ling, L., Gyaltsen, Y., Fontana, E., Taur, Y., Leiner, I.M., Pamer, E.G., 2017. Commensal microbes provide first line defense against *Listeria monocytogenes* infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(7), 1973-1989.
- Bolivar, A., Costa, J.C.C.P., Posada-Izquierdo, G. D., Valero, A., Zurera, G., Pérez-Rodríguez, F., 2018. Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in Mediterranean fish species from aquaculture production. *International Journal of Food Microbiology*, 270, 14-21.
- Borucki, M.K., Peppin, J.D., White, D., Loge, F., Call, D.R., 2003. Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7336-7342.
- Buchanan R.L., Gorris, L.G.M., Hayman, M.M., Jackson, T.C., Whiting, R.C., 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1-13.

- Clark, S.E., Filak, H.C., Guthrie, B.S., Schmidt, R.L., Jamieson, A., Merkel, P., Knight, V., Cole, C.M., Raulet, D.H., Lenz, L.L., 2016. Bacterial Manipulation of NK Cell Regulatory Activity Increases Susceptibility to *Listeria monocytogenes* Infection. *PLOS Pathogens*, 12(6).
- Coelho, C., Brown, L., Maryam, M., Vij, R., Smith, D.F.Q., Burnet, M.C., Kyle, J.E., Heyman, H.M., Ramirez, J., Prados-Rosales, R., Lauvau, G., Nakayasu, E.S., Brady, N.R., Hamacher-Brady, A., Coppens, I., Casadevall, A., 2019. *Listeria monocytogenes* virulence factors, including listeriolysin O, are secreted in biologically active extracellular vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 294(4), 1202-1217.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P., 2004. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (8), 3819-3822.
- Drevets, D.A., Bronze, M.S., 2008. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 53, 151-165.
- EURL *Lm*, 2014. EURL *Lm* Technical Guidance Document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Version 3 – 6 June 2014.
- EURL *Lm*, 2014. EURL *Lm* Technical Guidance Document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Version 3 of 6 June 2014 – Amendment 1 of 21 February 2019.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC), 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 16(12).
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., Stasiewicz, M.J., 2014. *Listeria monocytogenes* Persistence in Food-Associated Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health. *Journal of Food Protection*, 77(1), 150-170.
- Gahan, C.G.M., Hill, C., 2014. *Listeria monocytogenes*: survival and adaptation in the gastrointestinal tract. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4.

- Gambarin, P., Magnabosco, C., Losio, M.N., Pavoni, E., Gattuso, A., Arcangeli, G., Favretti, M., 2012. *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Seafood and Potential Hazards for the Consumers. *International Journal of Microbiology*.
- Goulet, V., King, L.A., Vaillant, V., de Valk, H., 2013. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infectious Diseases*, 13(11).
- Hansen C.H., Vogel, B.F., Gram, L., 2006. Prevalence and Survival of *Listeria monocytogenes* in Danish Aquatic and Fish-Processing Environments. *Journal of Food Protection*, 69(9), 2113-2122.
- Hoffman, A.D., Gall, K.L., Norton, D.M., Wiedmann, M., 2003. *Listeria monocytogenes* Contamination Patterns for the Smoked Fish Processing Environment and for Raw Fish. *Journal of Food Protection*, 66(1), 52-60.
- Huss, H.H., Jorgensen, L.V., Vogel, B.F., 2000. Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 267-274.
- Hwang C.A., Tamplin, M.L., 2005. The influence of mayonnaise pH and storage temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* in seafood salad. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 277-285.
- Iannetti, L., Acciari, V.A., Antoci, S., Addante, N., Bardasi, L., Bilei, S., Calistri, P., Cito, F., Cogoni, P., D'Aurelio, R., Decastelli, L., Iannetti, S., Iannitto, G., Marino, A.M.F., Muliari, R., Neri, D., Perilli, M., Pomilio, F., Prencipe, V.A., Proroga, Y., Santarelli, G.A., Sericola, M., Torresi, M., Migliorati, G., 2016. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Italy: Prevalence of contamination at retail and characterisation of strains from meat products and cheese. *Food Control*, 68, 55-61.
- Jamali, H., Paydar, M., Ismail, S., Looi, C.Y., Wong, W.F., Radmehr, B., Abedini, A., 2015. Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolated from open-air fish markets. *BMC Microbiology*, 15:144.
- Jami, M., Ghanbari, M., Zunabovic, M., Domig, K.J., Kneifel, W., 2014. *Listeria monocytogenes* in Aquatic Food Products - A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13.

- Jones, G.S., D’Orazio, S.E.F., 2017. Monocytes are the predominant cell type associated with *Listeria monocytogenes* in the gut, but they do not serve as an intracellular growth niche. *The Journal of Immunology*, 198, 2796-2804.
- Kramarenko, T., Roasto, M., Keto-Timonen, R., Mäesaar, M., Meremäe, K., Kuningas, M., Hörman, A., Korkeala, H., 2016. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat vacuum and modified atmosphere packaged meat and fish products of Estonian origin at retail level. *Food Control*, 67, 48-52.
- Lemon, K.P., Higgins, D.E., Kolter, R., 2007. Flagellar Motility Is Critical for *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, 189(12), 4418-4424.
- Liu, D., 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 645-659.
- Lomonaco, S., Nucera, D., Filipello, V., 2015. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infection, Genetics and Evolution*, 35, 172-183.
- Ollinger, J., Bowen, B., Wiedmann, M., Boor, K.J., Bergholz, T.M., 2009. *Listeria monocytogenes* σ^B Modulates PrfA-Mediated Virulence Factor Expression. *Infection and Immunity*, 77(5), 2113-2124.
- Orsi, R.H., den Bakker, H.C., Wiedmann, M., 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 79-96.
- Pagliano, P., Ascione, T., Boccia, G., De Caro F., Esposito, S., 2016. *Listeria monocytogenes* meningitis in the elderly: epidemiological, clinical and therapeutic findings. *Le Infezioni in Medicina* (2), 105-111.
- Pamer, E.G., 2004. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature*, 4.
- Petruzzelli, A., 2016. Modelli matematici predittivi, Challenge test, studi di Shelf-Life. Approfondimenti sull’applicazione dei criteri microbiologici nella valutazione dei piani di autocontrollo – Aziende di produzione di alimenti O.A. Fabriano, 7 luglio 2016.

- Pope, C., Kim, S.K., Marzo, A., Williams, K., Jiang, J., Shen, H., Lefrancois, L., 2001. Organ-Specific Regulation of the CD8 T Cell Response to *Listeria monocytogenes* Infection. *The Journal of Immunology*, 166, 3402-3409.
- Rawool, D.B., Doijad, S.P., Poharkar, K.V., Negi, M., Kale, S.B., Malik, S.V.S., Kurkure, N.V., Chakraborty, T., Barbuddhe, S.B., 2016. A multiplex PCR for detection of *Listeria monocytogenes* and its lineages. *Journal of Microbiological Methods*, 130, 144-147.
- Regolamento (CE) N. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee L 31/1*.
- Regolamento (CE) N. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 338/1*.
- Roccato, A., Uyttendaele, M., Membrè, J-M., 2017. Analysis of domestic refrigerator temperatures and home storage time distributions for shelf-life studies and food safety risk assessment. *Food Research International*, 96, 171-181.
- 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.
- Seeliger, H.P.R., Hohne, K., 1979. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Methods in Microbiology*, 13, 31-49.
- Su, X., Cao, G., Zhang, J., Pan, H., Zhang, D., Kuang, D., Yang, X., Xu, X., Shi, X., Meng, J., 2019. Characterization of internalin genes in *Listeria monocytogenes* from food and humans, and their association with the invasion of Caco-2 cells. *Gut Pathogens*, 11:30.
- Swaminathan B., Gerner-Smidt P., 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9(10), 1236-1243.
- Uyttendaele, M., Busschaert, P., Valero, A., Geeraerd, A.H., Vermeulen, A., Jacxsens, L., Goh, K.K., De Loy, A., Van Impe, J.F., Devlieghere, F., 2009. Prevalence and challenge tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 94-104.

- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J., 2001. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology*, 14 (3), 584-640.
- Zhu, Q., Gooneratne R., Hussain, M.A., 2017. *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. *Foods*, 6 (21).
- Ziegler, M., Kent, D., Stephan, R., Guldemann, C., 2019. Growth potential of *Listeria monocytogenes* in twelve different types of RTE salads: Impact of food matrix, storage temperature and storage time. *International Journal of Food Microbiology*, 296, 83-92.

SITOGRAFIA

- <http://www.ssica.it/content/view/179/30/lang,it/> (10/08/2019)
- <https://www.epicentro.iss.it/listeria/> (12/08/2019)
- <https://ilfattoalimentare.it/inghilterra-listeria-ospedali.html> (13/08/2019)
- <https://ilfattoalimentare.it/listeria-focolaio-salmone.html> (13/08/2019)
- https://www.ilmessaggero.it/mondo/listeria_carne_spagna_cosa_non_mangiare_morti_ultim_e_notizie_oggi_27_agosto_2019-4698609.html (28/08/2019)

