

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in

Medicina veterinaria

“DISTRIBUZIONE TOPOGRAFICA DI *LISTERIA* SPP.
SULLA COTENNA DEI SUINI MACELLATI
REGOLARMENTE”

Relatore:

Prof. Valerio Giaccone

Correlatore:

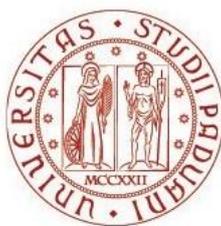
Dott. Massimo Marchesan

Laureando:

Manuel Santagiuliana

Matricola n. 1056133

Anno scolastico: 2016/2017



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in

Medicina veterinaria

“DISTRIBUZIONE TOPOGRAFICA DI *LISTERIA* SPP.
SULLA COTENNA DEI SUINI MACELLATI
REGOLARMENTE”

Relatore:

Prof. Valerio Giaccone

Correlatore:

Dott. Massimo Marchesan

Laureando:

Manuel Santagiuliana

Matricola n. 1056133

Anno scolastico: 2016/2017

Indice

Riassunto	7
Abstract	9
Capitolo 1: Introduzione e scopo	11
Capitolo 2: Rassegna bibliografica	13
2.1 La listeriosi animale e umana	13
2.1.1 La listeriosi animale	13
2.1.2 La listeriosi umana.....	16
2.2 Il genere <i>Listeria</i>	21
2.2.1 Classificazione tassonomica	21
2.2.2 Caratteristiche microbiologiche	22
2.2.3 Fattori di virulenza	24
2.2.4 Biofilm	27
2.3 La genesi della flora microbica del suino.....	31
2.3.1 Macellazione del suino.....	31
2.3.2 Punti critici durante la macellazione	33
2.3.3 Flora microbica superficiale del suino.....	34
2.3.4 Flora microbica fecale del suino.....	37
2.3.5 Prevalenza di <i>Listeria monocytogenes</i> nella carne di maiale.....	39
Capitolo 3: Parte sperimentale	41
3.1 Materiali	41
3.1.1 Raccolta dei campioni	41
3.1.2 Terreni di coltura.....	45
3.2 Metodi	47
3.2.1 Analisi microbiologiche	47
3.2.2 <i>Biolog Microbial ID System</i>	49
3.2.3 Metodi statistici.....	51
3.3 Risultati.....	52
3.3.1 Analisi qualitativa di <i>Listeria</i> spp.....	52
3.3.2 Grafici	53
3.3.3 Analisi <i>Biolog Microbial ID System</i>	56
3.3.4 Analisi statistiche.....	57
3.4 Commento dei risultati.....	59

Capitolo 4: Considerazioni e conclusioni	61
Capitolo 5: Riferimenti bibliografici	63
Capitolo 6: Sitigrafia	75
Ringraziamenti	77

Riassunto

La carne di maiale è ampiamente consumata nel mondo sia come prodotto tal quale sia come prodotto trasformato e nel futuro è previsto un consumo ancora maggiore a causa dell'incremento demografico. La carne di suino può trasmettere pericolose zoonosi batteriche tra cui la listeriosi. I sintomi clinici che la contraddistinguono possono variare dalle gastroenteriti alle forme più gravi come gli aborti, le meningiti e le setticemie. La listeriosi comporta un danno economico diretto causato dall'elevato tasso di ospedalizzazioni e un danno economico indiretto causato dalla diminuzione delle ore di lavoro delle persone colpite e dalle possibili sequele che possono perdurare per tutta la vita. La maggior parte delle infezioni si contraggono a livello domestico con l'assunzione di alimenti pronti al consumo con alte cariche microbiche. *Listeria* è un genere di batteri al cui interno si contano oggi 17 differenti specie di cui solo poche sono considerate patogene per l'uomo e gli animali.

La contaminazione della carne può derivare da vari momenti lungo la filiera alimentare. Uno dei primi istanti è rappresentato dalla macellazione, in cui i batteri contenuti nell'intestino e nel cavo orale possono arrivare alla carcassa e da questa alla carne. Vari autori hanno evidenziato come le listerie siano organismi ubiquitari e come possano essere presenti sulla cute, nel contenuto intestinale e nella carne dei suini macellati. La contaminazione di *L. monocytogenes* sulla cute è ben documentata con prevalenze molto variabili a seconda dello studio svolto. Tuttavia non si conosce la reale distribuzione di *Listeria spp.* sulla carcassa e quindi non si possono formulare ipotesi sulla reale dinamica di contaminazione durante le fasi di macellazione. Le domande a cui questa tesi ha cercato di dare risposta sono: quali zone della carcassa sono maggiormente contaminate? Quali effetti prima della macellazione possono influire sulla contaminazione?

In macello sono stati effettuati tre tamponi sulla testa, spalla e coscia di 150 maiali provenienti da 15 differenti allevamenti del Veneto, della Lombardia e del Piemonte. I risultati ottenuti suggeriscono una maggiore contaminazione della testa rispetto alla spalla e alla coscia. Il fattore che predispone alla contaminazione è il tempo medio trascorso in stalla di sosta con una maggiore positività per tempi di sosta superiori alle dieci ore. Questi risultati possono essere utili ai macelli per consentire un maggior controllo del flusso produttivo diminuendo le probabilità che *Listeria* riesca a replicare e diffondere massivamente nelle fasi successive di lavorazione.

Abstract

Pork is widely consumed all over the world, and in the future, there will be a larger consumption because of the global population growing. The swine meat can transmit dangerous zoonoses such as listeriosis. The clinical symptoms of listeriosis vary from mild gastroenteritis to the more severe form of abortion, septicemia and meningitis. Listeriosis results in a direct economic loss because of high hospitalization rate and an indirect loss due to the reduction of the working force and to the severe health implications. Most of the cases of listeriosis are domestically acquired because of consumption of ready to eat foods contaminated by high bacterial load. The genus *Listeria* contains 17 species but only few of them are pathogenic for humans and animals.

The contamination of the meat occurs in many steps during the food chain: one of the first moment is the slaughtering because the intestinal and mouth bacteria can spread to the carcass, thus contaminating the meat. Many authors found *Listeria* in the intestine, in the skin and in the meat of the slaughtered swine. The contamination of the skin from *Listeria monocytogenes* is well known but the distribution of *Listeria* spp. in different points of the carcass is still unknown. The questions this work tried to answer were the following: what points of the carcass are more contaminated? What critical points before slaughter could affect the contamination?

In the slaughterhouse, the carcasses were sampled using swabs in three point (ham, loin and head). A total of 150 pigs coming from Veneto, Lombardy and Piedmont were sampled. The results suggested a great contamination of the head followed by a smaller contamination of loin and of ham. Since the pigs waiting a long time before slaughter were more contaminated, the lairage facility influenced their *Listeria* contamination. These results can be helpful to the slaughters to manage better the food chain and diminishing the probability of *Listeria* to multiply in the following meat processing.

Capitolo 1

Introduzione e scopo

La listeriosi è una malattia alimentare sostenuta da batteri del genere *Listeria* con particolare riferimento a *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii*. Recentemente anche *Listeria innocua*, considerata da tempo non patogena, ha provocato casi di malattia alimentare (Perrin *et al.*, 2003).

La prima dimostrazione di malattia alimentare umana risale al 1950 in Germania dove il batterio venne trovato da Potel sia nel latte mastitico di una vacca sia in gemelli abortiti. Potel scoprì che la madre dei gemelli aveva assunto il latte contenente *Listeria monocytogenes* il giorno prima dell'aborto (Potel, 1952). Epidemie di listeriosi per consumo di alimento contaminato sono state dimostrate a partire dagli anni '80 (Schlech *et al.*, 1983).

Non è la malattia alimentare più diffusa (4 casi ogni milione di abitanti in UE) ma una delle più preoccupanti e costose da curare con una letalità che può raggiungere il 30% e che colloca questo batterio nella *top five* delle malattie alimentari a maggiore pericolosità in Unione Europea (EFSA, 2016). Dal 2000 in poi, in Europa, sono costantemente aumentati i casi di listeriosi (EFSA, 2016) e, se da un lato sono migliorati gli strumenti diagnostici e i sistemi di notifica, dall'altro, fattori come l'invecchiamento della popolazione (Eurostat, 2016), i cambiamenti socio-culturali (consumo di prodotti RTE, *Ready To Eat*) e la refrigerazione degli alimenti hanno contribuito a un aumento dell'incidenza. La prevenzione resta un obiettivo di primaria importanza al fine di evitare casi di listeriosi che, soprattutto nelle categorie a rischio, possono condurre a sepsi, aborti, polmoniti, meningiti e infezioni al sistema nervoso centrale (Donovan, 2015). La listeriosi, a differenza di altre malattie, è trasmessa nel 99% dei casi da alimenti quindi agire sulla sicurezza alimentare, sulla produzione degli alimenti, sull'igiene dei prodotti alimentari può prevenire delle morti o comunque dei casi anche gravi.

Listeria spp. è un microrganismo ubiquitario che si può trovare sia in alimenti di origine animale sia in alimenti di origine vegetale. Tra i prodotti di origine animale sicuramente la carne e i prodotti derivati occupano un ruolo centrale come pure il latte e latticini (Fleming *et al.*, 1985; Xavier *et al.*, 2014; Nayak *et al.*, 2015; Pouillot *et al.*, 2016).

Tuttavia epidemie recenti di listeriosi umana hanno evidenziato come questo microrganismo sia presente in una grande varietà di ortaggi e frutta dimostrando grande capacità di sopravvivenza e

replicazione nelle acque per la ferti-irrigazione e in generale nell'ambiente esterno, replicando anche a temperature di refrigerazione (McCollum *et al.*, 2013; Gaul *et al.*, 2013).

Per tale motivo rimane un microrganismo particolarmente difficile da eliminare in molti settori dell'industria alimentare come nei macelli e nei laboratori di sezionamento. Il suino occupa un ruolo di primaria importanza nella trasmissione e diffusione di *Listeria* lungo tutta la filiera alimentare perché da un lato alberga *L. monocytogenes* nell'intestino (Yokoyama *et al.*, 2005) e dall'altro perché, tra le carni rosse, la carne di maiale è la più consumata al mondo, con l'UE che ha il più alto livello di consumo pro capite (Colby e Punda, 2009; McNeill e Van Elswyk, 2012). In catena di macellazione l'eviscerazione, lo scuoiamento e la depilazione sono le fasi più critiche per la diffusione di microrganismi dal contenuto intestinale alla carcassa. Queste contaminazioni possono portare *Listeria* spp. sulla carcassa, sulla carne e nelle preparazioni successive aumentando così le possibilità del batterio di potersi replicare e causare un serio rischio per la salute pubblica.

È interessante capire se esiste una localizzazione spaziale di tali batteri sulla superficie della cotenna oppure no perché se si stabilisce una maggiore contaminazione in determinate zone si possono adottare misure correttive. In effetti, non sono mai stati eseguiti studi specifici su questo argomento quindi non riusciamo a stabilire o meglio non abbiamo dati che ci permettano di dire se le listerie che derivano dal contenuto intestinale si distribuiscano in maniera omogenea o se vi siano parti della carcassa che siano invece più contaminate di altre. In questo secondo caso sapere che la distribuzione di *Listeria* spp. sulle carcasse di maiale non è omogeneo e sapere dove si possa concentrare di più e dove di meno, potrebbe essere utile al fine di prevenire la diffusione di *Listeria monocytogenes* lungo la filiera della produzione delle carni e quindi prevenire la presenza di *Listeria* negli alimenti evitando possibili casi di listeriosi.

Di conseguenza conoscere meglio la dinamica di distribuzione di *Listeria monocytogenes* e di *Listeria* spp. sulla carcassa può essere fondamentale nella catena di macellazione.

Capitolo 2

Rassegna Bibliografica

2.1 La Listeriosi animale e umana

2.1.1 LISTERIOSI ANIMALE

Un gran numero di animali sono suscettibili alla listeriosi e tra loro i ruminanti rappresentano la categoria più colpita. Anche i lagomorfi possono essere interessati abbastanza frequentemente seguiti dai volatili. Suini, cavalli e pesci raramente sono coinvolti. Si stima che *L. monocytogenes* possa infettare più di 40 specie di mammiferi e uccelli.

Animale	Forme cliniche
Ruminanti	Aborto, nervosa, setticemica, oculare, mammaria, gastroenterica
Equini	Nervosa, aborto, setticemica, oculare, gastroenterica
Suini	Nervosa, portatori sani
Canidi, felidi	Nervosa, setticemica, cutanea, portatori sani
Lagomorfi	Aborto, nervosa, setticemica, mammaria, respiratoria, cutanea, congiuntivale
Roditori	Portatore sano e setticemica, congiuntivale e respiratoria nel topo solo portatore sano
Uccelli	Setticemica, gastroenterica, nervosa
Pesci	Setticemica, cutanea
Rettili	Portatori sani
Anfibi	Portatori sani

Tabella 1: Principali specie animali in cui *Listeria* è stata isolata e relative forme cliniche. Fonte: Lecuit, (2007)

Negli ultimi anni grazie al miglioramento delle tecniche zootecniche si è assistito a un grande calo dell'incidenza della malattia negli animali domestici. Se da un lato la progressiva riduzione delle manifestazioni cliniche ha portato alla risoluzione di un problema legato alla perdita di animali, dall'altro ha favorito una maggiore disseminazione di *Listeria monocytogenes* lungo la filiera alimentare dovuta a portatori sani asintomatici (Giaccone e Catellani, 2016).

Negli animali la maggior parte delle infezioni è sostenuta da *Listeria monocytogenes*. Altre forme di infezione, anche se più rare, possono essere provocate da altre specie del genere *Listeria* come *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi*.

I ruminanti sono la categoria di animali più frequentemente coinvolti da listeriosi. Le forme morbose più comuni nei ruminanti sono: encefalite, setticemia e aborti. Meno comunemente ci possono essere mastiti o cheratocongiuntiviti (Radostits *et al.*, 2006).

La via di contagio predominante è quella orale: *Listeria monocytogenes* sopravvive e replica negli insilati mal fermentati. La diffusione del microrganismo nelle feci è stagionale e più frequente nei mesi invernali e primaverili, periodi in cui si attua l'alimentazione con insilato (Radostits *et al.*, 2006).

L'invasione avviene nel tratto intestinale con una successiva disseminazione ematogena che può arrivare all'utero gravido causando quindi un'infezione uterina e setticemia. I meccanismi di disseminazione e successiva infezione del sistema nervoso centrale non sono ancora ben chiari: si ipotizza che il batterio possa entrare nei nervi cranici del trigemino attraverso lesioni della mucosa orale e da lì invadere il sistema nervoso (per esempio al momento della comparsa dei denti definitivi (Dirksen *et al.*, 2004)).

Il periodo di incubazione nel bovino è variabile e di circa due settimane.

Se il bovino è colpito da listeriosi encefalica si possono manifestare i seguenti segni:

- Movimenti in circolo (*circling disease*);
- Paralisi facciale monolaterale;
- Depressione del sensorio;
- Ptosi di labbra, padiglioni auricolari, palpebre;
- Ridotta/assente sensibilità della cute del lato colpito per interessamento del trigemino;
- Strabismo convergente dell'occhio del lato colpito (nervo abducente);
- Scialorrea.

Questi disturbi via via si possono aggravare portando a morte l'animale in 1-2 settimane per paralisi respiratoria.

Le diagnosi differenziali dell'encefalite da *Listeria monocytogenes* sono l'avvelenamento da Piombo, il botulismo, la BSE (encefalopatia spongiforme bovina), la meningoencefalite tromboembolica da poliencfalomalacia e la cenurosi cerebrale. Tuttavia queste malattie non si caratterizzano, come nella listeriosi, da un coinvolgimento monolaterale (Smith, 1996).

Se il bovino è colpito dalla forma setticemica generalmente i sintomi sono aspecifici: astenia, febbre, diarrea con un decorso da acuto ad iperacuto e con la morte dell'animale nel giro di 12 ore. Solitamente questa forma viene maggiormente contratta da vitelli con meno di due settimane di vita ma non si escludono anche animali più anziani (Dirksen *et al.*, 2004).

La cheratocongiuntivite di solito si associa al contatto diretto dell'occhio con l'insilato contaminato con successivo sviluppo della fotofobia.

La mastite da *Listeria monocytogenes* può decorrere in forma subclinica, cronica e raramente clinica. Molto spesso, infatti, i bovini possono eliminare asintomaticamente *Listeria monocytogenes* con il latte come dimostrato da di Jamali e Radmehr, (2014) i quali hanno isolato *Listeria* spp. in 21 dei 207 campioni di latte mastitico. Di questi, 17 erano positivi per *Listeria monocytogenes* dimostrando come questa sia tra tutte le listerie la principale causa di mastite.

Nelle pecore, altra specie molto colpita, la listeriosi si manifesta in maniera simile alla patologia che interessa i bovini. Alcune differenze sono legate al fatto che nella pecora il periodo di incubazione può essere leggermente più lungo di una settimana rispetto al bovino e al fatto che nella pecora la morte è più rapida e sopraggiunge in un intervallo di tempo di 2-3 giorni nella forma encefalica (Giaccone e Catellani, 2016).

Le forme morbose più comuni nelle pecore sono la forma encefalica, gli aborti e la setticemia.

La forma encefalica delle pecore è simile a quella dei bovini, l'unica differenza può essere la minor manifestazione del *circling disease* e una maggior propensione di movimenti propulsivi rettilinei afinalistici. Questo atteggiamento permette di differenziare la listeriosi ovina dalla tossiemia gravidica che presenta come segno la continua pressione della testa dell'animale su una superficie verticale (Scott, 2013).

Gli aborti sono causati dall'infezione della placenta da parte di *Listeria monocytogenes* e la successiva espulsione del feto prematuro nell'ultimo trimestre di gravidanza. Il feto può presentare epatite, splenite e polmonite e queste lesioni si possono trovare anche nel caso di setticemia neonatale causata da eliminazione di *Listeria monocytogenes* da parte di pecore subclinicamente infette.

La diagnosi di listeriosi è difficile da raggiungere poiché altre malattie danno sintomatologia sovrapponibile: la chetosi e l'enterotossiemia hanno gli stessi sintomi della setticemia da *Listeria*, l'encefalite virale produce gli stessi segni dell'encefalite data da *Listeria monocytogenes* (Giaccone e Catellani, 2016).

Nelle capre la listeriosi è caratterizzata da sintomatologia, periodo di incubazione e stagionalità sovrapponibili a quelli della pecora. Una differenza riguarda la minor resistenza della capra a *Listeria monocytogenes* e quindi a un maggior numero di casi fatali.

Altri animali da reddito come i suini e i cavalli generalmente non sono colpiti da questa malattia, ma, soprattutto per quanto riguarda i suini, possono fungere da eliminatori nel contenuto intestinale come

suggerito da Yokoyama e coll., (2005) in cui su 100 campioni da contenuto cecale di suini, 74 sono risultati positivi a *L. monocytogenes*.

Data la natura altamente resistente del batterio, il controllo della malattia è difficile, tuttavia si può agire su una buona gestione dell'allevamento e sulla preparazione dell'insilato evitando cambiamenti repentini di dieta, stress e sovraffollamento (Dirksen, *et al.*, 2004).

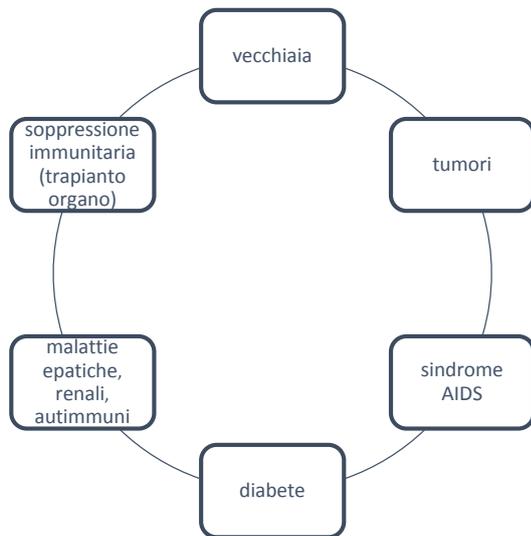
2.1.2 LISTERIOSI UMANA

La listeriosi umana è una grave forma di malattia alimentare causata da batteri del genere *Listeria* tra i quali il maggior responsabile è *L. monocytogenes*. Anche altre specie di *Listeria* possono causare malattia come *L. ivanovii* e *L. innocua*.

È una malattia rara, negli Stati Uniti colpisce annualmente circa 2500 persone (Scallan *et al.*, 2011). Ha una letalità molto elevata che si aggira sul 20-30% anche in soggetti che ricevono adeguate cure mediche e antibiotiche portando ad un elevato tasso di ospedalizzazione (94%) (Chen e Nightingale, 2013).

L'infezione è più probabile e fatale in soggetti con sistema immunitario compromesso (rischio relativo 500 volte maggiore di contrarre la listeriosi in persone con AIDS rispetto a persone sane), bambini (100 casi per milione di abitanti), anziani con più di 65 anni (14 casi per milione di abitanti) e donne incinte (probabilità 20 volte maggiore di sviluppare listeriosi rispetto alla popolazione sana) (Lecuit, 2007).

La listeriosi può manifestarsi come gastroenterite aspecifica nei soggetti normali, questa forma è poco



diagnosticata e talvolta confusa con altre forme batteriche e si risolve spontaneamente nel giro di qualche giorno (Donovan, 2015).

Se invece vengono colpiti i soggetti a rischio si sviluppano encefaliti, aborti, sepsi.

Ad oggi si contano 13 sierotipi di *Listeria monocytogenes*, ma solo pochi sono considerati patogeni e comprendono:

- Sierotipo 1/2a;
- Sierotipo 1/2b;
- Sierotipo 4b.

In uno studio danese si dimostra la maggior letalità provocata dal sierotipo 4 rispetto al sierotipo 1/2. Il 26% di pazienti infettati col sierotipo 4 di *L. monocytogenes* sono morti rispetto al 16% di pazienti infettati col sierotipo 1/2 (Swaminathan e Gerner-Smith, 2007).

Una volta entrato in contatto con la mucosa intestinale, il batterio si lega a uno specifico recettore dell'enterocita e lo invade. Tramite endocitosi arriva alle cellule endoteliali entrando nel circolo sanguigno e diffondendo sistematicamente (Pizarro-cerda e Ku, 2012).

Le donne gravide colpite da listeriosi possono avere sintomi simil-influenzali: dolori, debolezza, febbre. In gravidanza inoltre aumenta enormemente il rischio di aborto e di nascita di feti disvitali. Il batterio infatti infetta dapprima la placenta e poi il feto portando a microascessi epatici, splenici e cutanei. Il feto può anche nascere normalmente e sembrare apparentemente sano ma morire dopo pochi giorni per una forma acuta e letale (Lecuit, 2007).

Oltre alla disseminazione ematogena, *Listeria monocytogenes* riesce a raggiungere il SNC provocando meningoencefaliti mortali. La meningite provocata da *Listeria* ha il più alto tasso di letalità (22%) di tutte le altre meningiti batteriche ed è la seconda causa di meningite batterica in persone di età superiore ai 50 anni (Lecuit, 2007).

Nel sistema nervoso centrale *L. monocytogenes* può dar adito a due tipi di lesioni: una romboencefalite oppure ascessi intraparenchimatici. La romboencefalite è la forma più diffusa e la sintomatologia più tipica riguarda la paralisi facciale monolaterale, la sindrome cerebellare (convulsioni, perdita di equilibrio), la perdita di sensibilità dei nervi cranici. La seconda forma data da ascessi

intraparenchimatici cerebrali riguarda una minima parte di persone affette da listeriosi: le zone del SNC maggiormente interessate riguardano ponte, midollo allungato, talamo, aree subcorticali (Mylonakis, *et al.*, 1998).

Il periodo di incubazione è estremamente variabile, si passa da 2 a 70 giorni di incubazione rendendo in questo modo molto difficile la diagnosi (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007).

La via di infezione è orale e si trasmette nel 99% di casi con il cibo, specialmente con gli alimenti RTE e quelli altamente processati e con lunghi tempi di conservazione. Sperimentalmente è stato dimostrato che nei primati per avere un effetto clinico è necessaria una concentrazione di 10^9 cellule nel cibo (Farber *et al.*, 1991). Molto raramente si può avere una trasmissione diretta tra animale e uomo.

Anno	Paese	N. di casi	N. casi perinatali	N. di morti	Veicolo sospetto/implicato
1981	Nuova Scozia, Canada	41	34	18	Insalata
1983	Massachusetts, USA	49	7	14	Latte pastorizzato
1985	California, USA	142	94	48	Formaggio messicano
1983-1987	Svizzera	122	65	34	Formaggio
1987-1989	Regno unito	366	?	?	Paté
1989-1990	Danimarca	26	3	7	Formaggio verde
1992	Francia	279	0	85	Lingua di suino in gelatina
1993	Francia	38	31	10	<i>Rillettes</i>
1998-1999	Focolai diffusi multipli, USA	108	?	14	<i>Hot dog</i>
1999	Finlandia	25	0	6	Burro
1999-2000	Francia	10	3	3	<i>Rillettes</i>
1999-2000	Francia	32	9	10	Lingua di suino in gelatina
2000	Focolai diffusi multipli, USA	30	8	7	Prodotto RTE a base carnea
2000	Nord Carolina, USA	13	11	5	Formaggio messicano
2002	Focolai diffusi multipli, USA	54	12	8	Prodotto RTE a base carnea
2002	Québec, Canada	17	3	0	Formaggio a latte crudo
2003	Texas, USA	12	?	?	Formaggio messicano

Tabella 2: Focolai internazionali di listeriosi invasiva di origine alimentare dal 1981 al 2003. Fonte: Swaminathan e Gerner-Smidt, (2007)

Secondo l'EFSA, (2016) i principali alimenti che possono essere contaminati da *Listeria monocytogenes* sono:

- Latte crudo non pastorizzato;
- Prodotti di gastronomia a base di carne;
- Formaggi molli;
- Pesce affumicato;
- Germogli e verdura fresca.

Per quanto riguarda l'epidemiologia della malattia, come segnala l' EFSA (2016), l'Europa nel 2015 ha riportato 2206 casi di listeriosi distribuiti in 28 Stati membri con un numero totale di 270 morti e una media di 0,46 casi ogni 100 mila abitanti. Il 99,7% dei casi è stato ospedalizzato e il tasso di letalità si attesta sul 17,7%. L'infezione da *Listeria* si riporta maggiormente in persone con meno di un anno di vita e in quelle con più di 65 anni di età, con un gruppo consistente di anziani di 84 anni (vedi figura 1).

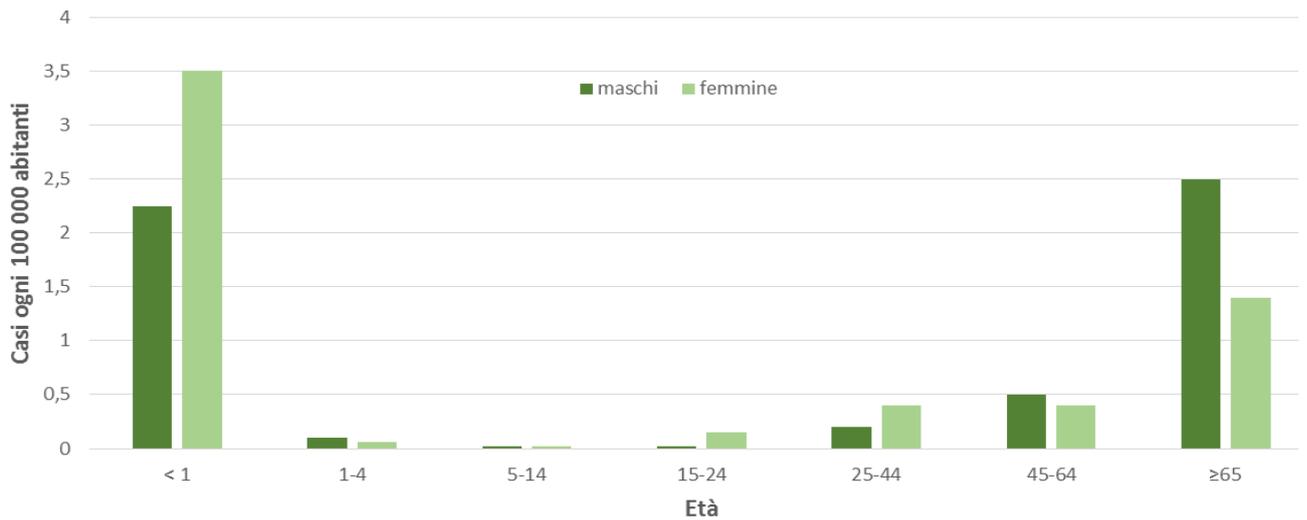


Figura 1: Casi riportati di listeriosi ogni 100 mila abitanti a seconda dell'età e del sesso nel 2014. Fonte ECDC, (2017).

La malattia può essere considerata “stagionale” con un aumento del numero di casi nei mesi estivi, (Figura 2).

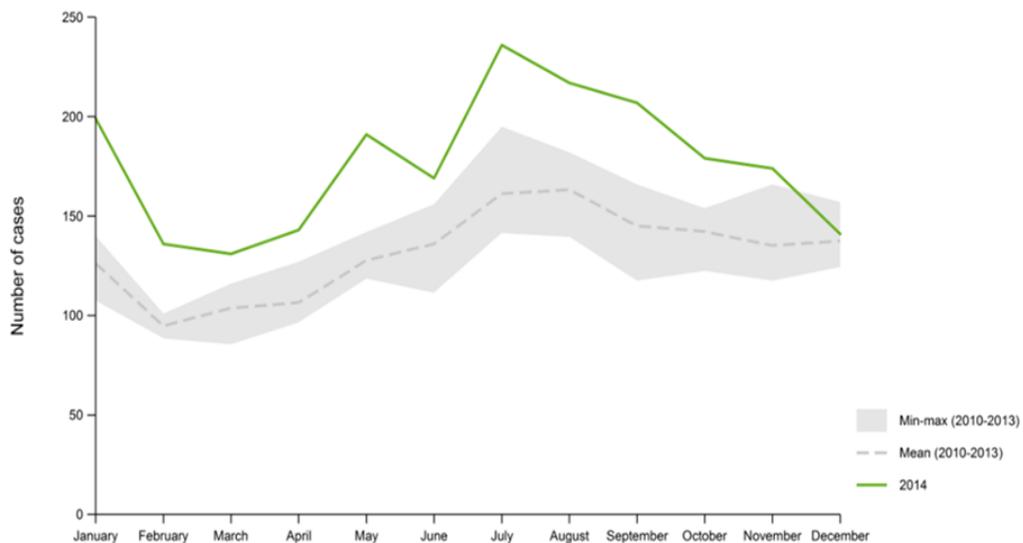


Figura 2: Distribuzione stagionale di casi confermati di listeriosi in UE nel 2014 rispetto il 2010-2013
Fonte: ECDC, (2017)

Nel 2013 secondo l'EFSA, (2015) ci sono stati 7 focolai di listeriosi in UE:

- 3 focolai riguardano il consumo di crostacei, molluschi e prodotti derivati;
- 1 focolaio riguarda il consumo di formaggio;
- 1 focolaio riguarda il consumo di carne e prodotti derivati;
- 1 focolaio riguarda il consumo di carne di suino e prodotti derivati;
- 1 focolaio riguarda il consumo di verdure, succhi di frutta e prodotti simili.

Negli Stati Uniti, grazie a provvedimenti messi in atto dal 1995, si è assistito a una diminuzione di casi di listeriosi associati al consumo di prodotti RTE, carni rosse e pollame. Tuttavia non si è riscontrata una diminuzione simile nei prodotti lattiero-caseari e, parallelamente, sono aumentati episodi epidemici legati all'assunzione di frutta, verdura e gelato. Secondo il CDC (*Center for Disease and Control*) ogni anno mediamente negli USA si verificano 1600 casi di listeriosi con 260 morti.

Anno	Paese	N. di casi	N. di morti	Veicolo sospetto/implicato
2010	Texas	10	5	Verdura quarta gamma
2011	Focolai diffusi multipli	147	33	Melone
2012	Focolai diffusi multipli	22	4	Ricotta salata
2013	Focolai diffusi multipli	6	1	Formaggio
2014	Illinois, Michigan	5	2	Germogli di soia
2014-2015	Focolai diffusi multipli	35	7	Mele cotte caramellate
2014	Focolai diffusi multipli	5	1	Formaggio
2014	California, Maryland	8	1	Formaggio molle
2015	Focolai diffusi multipli	10	5	Gelato
2015	Focolai diffusi multipli	30	3	Formaggio fresco
2016	Focolai diffusi multipli	19	1	Verdura quarta gamma
2016	California, Florida	2	1	Latte crudo
2016	Focolai diffusi multipli	9	3	Verdura surgelata
2017	Focolai diffusi multipli	8	2	Formaggio molle a latte crudo

Tabella 3: Focolai di listeriosi invasiva di origine alimentare negli Stati Uniti dal 2010 al 2017. Fonte: CDC, (2017).

La prevenzione a livello domestico si attua agendo sulle buone prassi di preparazione degli alimenti:

- Lavare le mani e le verdure in modo appropriato;
- Mantenere l'ambiente lavato e pulito;
- Cucinare la carne adeguatamente;
- Evitare di usare strumenti sia per il cibo crudo che per quello cotto;
- Conservare l'alimento adeguatamente, evitando per esempio la refrigerazione protratta di prodotti pronti al consumo;
- Evitare di assumere gli alimenti incriminati soprattutto dalle categorie a rischio.

La terapia nei soggetti colpiti ha risultati variabili e questo è dovuta in parte al fatto che *Listeria* sia un patogeno intracellulare e in parte al fatto che, data la rarità della malattia, non siano state eseguite terapie standardizzate sulle persone colpite. Studi *in vitro* hanno dimostrato come *Listeria monocytogenes* è suscettibile a: penicillina G, ampicillina, eritromicina, trimethoprim, sulfametoxazolo, rifampicina e aminoglicosidi. In genere il farmaco più usato è l'ampicillina e nei soggetti che non la tollerano si usa l'associazione trimethoprim con sulfametoxazolo. *Listeria monocytogenes* è resistente alle tetracicline pertanto questo farmaco non deve essere usato in corso di listeriosi. La terapia deve avere una durata di 10-14 giorni per la forma setticemica e di 14-21 giorni per la forma encefalica. La cura antibiotica si associa ad adeguate terapie di supporto (Donovan, 2015).

2.2 Il genere *Listeria*

2.2.1 CLASSIFICAZIONE TASSONOMICA

Dominio: Bacteria

Regno: Eubacteria

Phylum: Firmicutes

Classe: Bacilli

Ordine: Bacillales

Famiglia: Listeriaceae

Genere: *Listeria*

Specie: *L. grayi*, *L. monocytogenes* (1980); *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* (1983); *L. ivanovii* (1992); *L. rocourtiae*, *L. marthii* (2010); *L. fleishmanni*, *L. weihenstephanensis* (2013), *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. floridensis*, *L. grandensis*, *L. riparia* (2014); *L. newyorkensis*, *L. booriae* (2015).

Ad oggi il genere *Listeria* conta 17 specie e una 18° sta per essere confermata: *L. thailandensis* (Leclercq et al., 2016).

2.2.2 CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE

Listeria è un batterio Gram positivo, non sporigeno, anaerobio facoltativo ampiamente diffuso nell'ambiente ma presente anche nell'intestino di animali e uomo, sulla cute, negli alimenti, nelle acque di irrigazione, sulle superfici inorganiche (in queste ultime grazie alla formazione di microarchitetture di sostanza organica chiamate biofilm) (ILSI e Walls, 2005; Thévenot *et al.*, 2006; Buchanan *et al.*, 2017).

Le listerie "classiche" ovvero quelle isolate tra il 1924 e il 1985 si isolano molto frequentemente negli alimenti. Le "nuove" listerie oltre ad essere rinvenute in una grande quantità di alimenti si rinvenivano da nicchie ambientali come ambienti agricoli e ambienti naturali (Barre *et al.*, 2016).

Il genere *Listeria* è:

- Psicrotrofo: cresce a temperature che variano dai -1 °C ai 45 °C, tuttavia esistono delle specie-specificità i.e. *L. floridensis*, *L. aquatica* e *L. fleischmanni* non crescono a temperature inferiori o pari a 7°C (den Bakker *et al.*, 2014; Orsi e Wiedmann, 2016).
- Alotollerante: riesce a moltiplicare anche in matrici alimentari ad alta salinità (10%) e con A_w (*water activity*) di 0.900-0.880.
- Acidurico: il pH ottimale di crescita varia da 4 a 9,5 però riesce a sopravvivere anche al di fuori di questo *range* se prima è stato esposto a dosi subletali di acidità.
- Catalasi positivo.
- Ossidasi negativo.

Questo genere di batteri non riesce a idrolizzare l'urea o a produrre H₂S e fermenta il glucosio ad acido lattico senza generare anidride carbonica.

La temperatura in grado di inattivare sensibilmente *Listeria monocytogenes* è uguale o superiore a quella di pastorizzazione (maggiore di 72°C in 10 secondi). Tuttavia non sempre questa temperatura è in grado di eliminare al completo il batterio come ipotizzato da Fleming e coll., (1985) i quali hanno studiato un'epidemia di listeriosi derivata da latte pastorizzato.

Tutti i membri del genere *Listeria* sono di forma bastoncellare e misurano mediamente 0,5 µm in diametro e 2,1 µm in lunghezza, tuttavia possono misurare anche 100 µm in colonie che abbiano subito uno shock osmotico (forma filamentosa).

Secondo den Bakker e coll., (2014) la motilità si riscontra nelle seguenti specie:

- *L. monocytogenes*;
- *L. innocua*;
- *L. seeligeri*;
- *L. ivanovii*;
- *L. welshimeri*;
- *L. marthii*;
- *L. grayi*.

Le listerie sono motili a temperature di 20-25 °C grazie all'azione di flagelli peritrichi. Tuttavia a temperature di 37°C i flagelli vengono persi e si pensa che questo sia uno dei fattori patogenetici necessari per invadere le cellule ospiti.

Solo tre specie sono emolitiche:

- *L. monocytogenes*;
- *L. seeligeri*;
- *L. ivanovii*.

L. monocytogenes e *L. ivanovii* sono dei patogeni intracellulari facoltativi, le restanti 15 specie sono considerate saprofiti ambientali (den Bakker *et al.*, 2014; Weller *et al.*, 2015). Tuttavia in tempi recenti si sono verificati episodi di listeriosi causati da: *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. murray*.

Alcuni esempi sono:

- Meningite purulenta acuta da *L. seeligeri* in un paziente immunocompetente (Rocourt *et al.*, 1986)
- *L. innocua* isolata in un caso di meningoencefalite ovina (Walker *et al.*, 1994).
- Batteriemia da *L. grayi* in un paziente con morbo di Hodgkin (Todeschini *et al.*, 1998).
- Batteriemia fatale da *L. innocua* in una donna (Perrin *et al.*, 2003).
- *L. innocua* atipica, con caratteristiche e geni di virulenza tipici di *L. monocytogenes* in macelli di suini (Moreno *et al.*, 2012).
- Un caso di meningoencefalite fatale da *L. innocua* in un vitellone da carne (Rocha *et al.*, 2013).

Questi casi evidenziano come il genere *Listeria* sia in continua evoluzione e come *L. innocua*, strettamente imparentata con *L. monocytogenes*, possa aver acquisito geni di virulenza o per via

orizzontale (Johnson *et al.*, 2004) oppure perché deriva da un antenato ancestrale comune a *L. monocytogenes* (Volokhov *et al.*, 2007).

2.2.3 FATTORI DI VIRULENZA

Listeria monocytogenes possiede molti meccanismi che consentono di invadere, colonizzare e diffondersi da cellula a cellula. Questi processi sono stati studiati nel corso degli anni da vari ricercatori e nuove pubblicazioni continuano ad ampliare il repertorio di strategie che questo batterio usa per manifestare la sua patogenicità (Cossart and Toledo-Arana, 2008; Buchanan *et al.*, 2017).

Il primo ostacolo per *Listeria monocytogenes* è l'acidità gastrica. I microrganismi possono dotarsi di diversi meccanismi per sfuggire a condizioni di basso pH tra cui pompe protoniche, alterazioni nella parete cellulare oppure aumento dell'espressione di regolatori come il sistema GAD (*glutamate decarboxylase*). Grazie alla decarbossilazione del glutammato, in presenza di un'alta acidità, il microrganismo è in grado di convertire extracellularmente una molecola di glutammato a una di GABA (gamma-amminobutirrato) grazie all'espulsione di un protone intracellulare, potendo così sfruttare l'effetto tampone dato dal GABA e la riduzione dell'acidità interna al batterio (Hill *et al.*, 2002).

In secondo luogo, dopo aver oltrepassato lo stomaco ed essere giunto in prossimità dell'intestino tenue, *Listeria monocytogenes* è in grado di sopravvivere ai sali biliari grazie al sistema BSH (*bile salt hydrolase*) che idrolizza il legame amidico dei sali biliari coniugati. Gli acidi biliari, infatti, oltre a svolgere un'azione digestiva sono anche una barriera antimicrobica e riescono a modulare la flora batterica. Dussurget e coll., (2002) hanno dimostrato come *L. monocytogenes* possieda questo enzima a livello citosolico che idrolizza i sali biliari in condizione di microaerofilia come nell'intestino. Il lavoro svolto evidenzia anche come il BSH possa essere considerato un fattore di virulenza data la sua presenza solo in specie di *Listeria* patogene: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*. Tale meccanismo permette a *Listeria monocytogenes* di colonizzare e di crescere nel fegato dopo l'invasione dall'intestino.

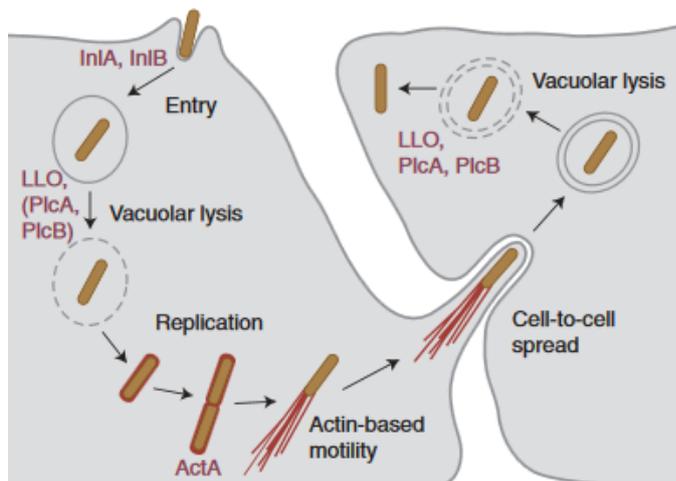
I fattori chiave affinché *L. monocytogenes* riesca ad invadere l'organismo sono l'adesione e l'interazione con l'enterocita e la successiva replicazione intracitoplasmatica.

La penetrazione del batterio all'interno della cellula ospite è resa possibile grazie all'azione di proteine chiamate internaline di cui ne sono state scoperte 28. Tuttavia le più studiate sono solo due: Int A e Int B. La prima è coinvolta nell'*uptake* da parte dell'enterocita e agisce nelle prime fasi dell'infezione. Il recettore a cui si lega (E-caderina) è coinvolto sia nella diffusione del batterio nell'enterocita sia a livello

la sua endocitosi. La clatrina provoca la riorganizzazione dell'actina cellulare al sito di entrata di *Listeria monocytogenes* formando un vacuolo. I meccanismi che portano all'invasione delle cellule epiteliali sono molto complessi come si può notare in figura 3.

Una volta penetrata dentro la cellula, *Listeria monocytogenes* utilizza un cluster di 6 geni localizzati nel locus LIPI-1 (*Listeria Pathogenicity Island 1*): *prfA*, *plcA*, *plcB*, *hly*, *mpl*, *actA*. In particolare utilizza la listeriolisina O (LLO) codificata da *hly* e due fosfolipasi codificate da *plcA* e *plcB* per destabilizzare il vacuolo ed essere in grado di replicare nel citosol.

prfA è un attivatore trascrizionale e promuove l'espressione di molti geni preposti all'infezione. *prfA* infatti si trova in uno stato di bassa attività quando si trova fuori dalla cellula ospite, al contrario di quando si trova al suo interno. *mpl* è fondamentale per la maturazione di un proenzima alla fosfolipasi C.



Successivamente *Listeria monocytogenes*, tramite Act A, recluta l'actina cellulare diventando in questo modo motile ad un polo (10 $\mu\text{m/s}$) e potendo entrare nella cellula adiacente ripetendo il ciclo di crescita precedentemente descritto.

Figura 4: Ciclo intracellulare di *L. monocytogenes*. Fonte: Pizarro-cerda & Ku, (2012).

Recentemente sono stati descritti altri fattori di virulenza:

- Oat A (o-acetiltransferasi): coinvolto nella modificazione di peptidoglicani batterici e responsabile di una diminuzione della risposta immunitaria, aumentando la sopravvivenza di *L. monocytogenes* nel topo (Aubry *et al.*, 2011).
- Lip A (*Listeria phosphatase A*): coinvolto nella fosforilazione e partecipa di molte funzioni cellulari, batteri carenti del gene *lipA* hanno una minor sopravvivenza nel topo (Kastner *et al.*, 2011).
- Lnt A (*Listeria nuclear target A*): associato a BAHD1, un repressore nucleare di tipo 3 di interferoni. Una sua mancanza comporta una produzione di interferone γ supportando l'idea che Lnt A sia coinvolto nel reindirizzare la risposta immunitaria. Infatti il ceppo di *L. monocytogenes* mancante di *Lnt A* si ritrova in minor quantità nella milza di topo se confrontato con il ceppo "selvaggio" (Lebreton *et al.*, 2011).

2.2.4 BIOFILM

La capacità di *Listeria* spp. di sopravvivere per lunghi periodi nell'ambiente esterno risiede in larga parte nella sua abilità di formare biofilm.

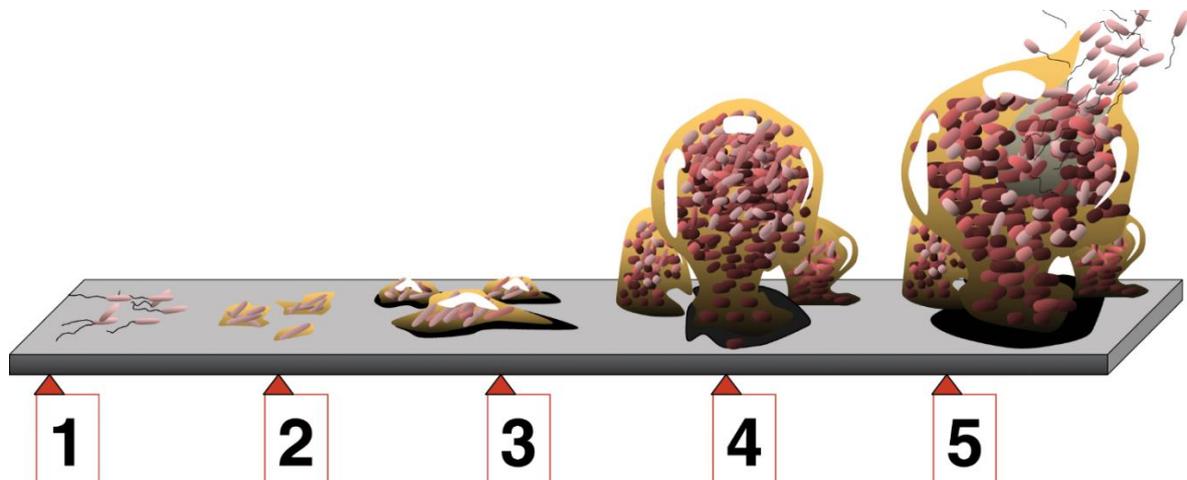


Figura 5: Formazione di biofilm da *Listeria* in quattro fasi: adesione iniziale (1), adesione irreversibile (2), maturazione (3 e 4) e dispersione (5). Fonte: Monroe, (2007)

Il biofilm è una massa di microrganismi fortemente adesi alle superfici sia organiche che inorganiche, circondata da una matrice extracellulare formata prevalentemente da mucopolisaccaridi, con un fenotipo diverso rispetto quello delle cellule planctoniche (Kocot e Olszewska, 2017).

La formazione del biofilm è divisa in quattro fasi. La prima fase è detta “adesione iniziale” ed è caratterizzata dall’interazione tra il batterio e la superficie grazie a forze fisiche come la forza gravitazionale, la forza elettrostatica e forze di Van der Waals. In questo primo stadio sono di grande importanza le fimbrie e i flagelli che hanno funzione adesiva. Lo stadio successivo, quello di “adesione irreversibile”, è caratterizzato da una minore distanza tra batterio e batterio e da una maggiore forza di interazione grazie all’ esposizione di ligandi sulla superficie batterica e alla secrezione di sostanze polimeriche extracellulari attorno alle cellule del biofilm. Il terzo stadio detto “maturazione” coinvolge la formazione di micro colonie, l’aumento del volume del biofilm e la sua architettura caratteristica. Nello stadio finale o “dispersione”, i batteri sfaldano dal biofilm come conseguenza di un’aumentata densità tra gli strati batterici e quindi si ha il ritorno di batteri nell’ambiente esterno con la possibilità di colonizzare altre superfici e produrre altri biofilm.

Un ruolo chiave nella formazione del biofilm risiede nella comunicazione da cellula a cellula. I batteri coordinano le loro attività tramite segnali chimici che si legano ai recettori propri della cellula e a quelli delle cellule adiacenti. Il segnale è amplificato e trasmesso tramite sistemi regolatori causando

l'espressione di geni target che modulano processi fisiologici e metabolici di sviluppo del biofilm. In *Listeria* la comunicazione tra cellula e cellula (*quorum sensing*) è possibile grazie ad autoinduttori (AI), ossia oligopeptidi originati dalla degradazione di precursori proteici più grandi (Myszka and Czaczyk, 2010).

Listeria monocytogenes può formare biofilm su una grande varietà di materiali: acciaio, vetro, gomma, politetrafluorene, polivinilcloruro, alluminio, policarbonato, polipropene e poliuretano (Bonsaglia *et al.*, 2014).

La popolazione microbica può essere mista o pura. Nel caso di popolazione mista si ha una maggiore resistenza ad agenti sanitizzanti come nel caso di *Listeria monocytogenes* e *Lactobacillus plantarum* (Van der Veen e Abee, 2011).

Il biofilm è problematico nell'industria alimentare per i danni economici diretti che può causare e per il rischio alla salute pubblica. Infatti batteri del biofilm possono persistere per mesi e anche per anni (Ferreira *et al.*, 2014).

I fattori determinanti nella produzione del biofilm sono espressi in tabella 4.

Fattore	Ruolo nella formazione del biofilm
PrfA	Fattore di virulenza e regolatore della biosintesi dei flagelli
Flagelli	Adesione alla superficie, cellule non mobili non riescono a formare biofilm
LuxS	Inibizione della formazione del biofilm tramite conversione nella molecola dell'autoinduttore AI2
agrA	Adesione e regolazione delle fasi iniziali della formazione del biofilm
relA	Regolazione in risposta alla carenza di elementi vitali
hpt	Regolazione in risposta alla carenza di elementi vitali
SecA2	L'inattivazione promuove l'aggregazione batterica, l'architettura e la formazione del biofilm
BapL	Proteina associata al biofilm necessaria per l'adesione cellulare

Tabella 4: Determinanti molecolari nella formazione del biofilm di *Listeria monocytogenes*. Fonte: Kocot e Olszewska, (2017)

Un altro fattore molto importante che influenza il biofilm è il sierotipo. In particolare si è dimostrato che il sierotipo 1/2a e il sierotipo 1/2b formano un biofilm più consistente rispetto al sierotipo 4b in un terreno ricco di nutrienti. Al contrario in un terreno povero l'abilità a formare biofilm è simile per il sierotipo 1/2a e 4b e diminuita nel sierotipo 1/2b (Kadam *et al.*, 2013). Pan, Breidt e Kathariou (2009) hanno dimostrato che il sierotipo 1/2a ha una maggior abilità nel produrre biofilm se confrontato con il sierotipo 4b tuttavia la sopravvivenza di quest'ultimo è aumentata mentre cresce in un biofilm in cui è presente anche il sierotipo 1/2a. Studi successivi però hanno dimostrato che la formazione del biofilm

non dipende dal sierotipo (Doijad *et al.*, 2015) oppure che esiste solo una debole correlazione tra formazione di biofilm e *lineage* genetico (Guilbaud *et al.*, 2015).

La resistenza dei batteri del biofilm ad agenti sanitizzanti è ben documentata:

- È necessaria una concentrazione di ipoclorito di sodio 100 volte maggiore per una sostanziale riduzione di *L. monocytogenes* nel biofilm rispetto alla forma planctonica (Norwood e Gilmour, 2000).
- L'associazione di *L. monocytogenes* e *P. putida* accelera la formazione del biofilm e aumenta la resistenza a BAC (benzalconio cloruro) rispetto a biofilm di monoculture (Ibusquiza *et al.*, 2011).
- Cinque ceppi di *L. monocytogenes* hanno sviluppato una risposta adattativa nei confronti del perossido di idrogeno e sono diventati resistenti dopo ripetute esposizioni all'agente perossidante (Pan *et al.*, 2006).
- L'esposizione ad agenti a base di perossido di idrogeno aumenta la resistenza del biofilm ai composti dell'ammonio quaternario (Shi e Zhu, 2009).

L'abilità di *Listeria* spp. nel riuscire a sopportare le procedure di lavaggio e disinfezione risiede anche nella sua capacità nel produrre il biofilm. Questo vantaggio evolutivo del batterio pone un serio rischio per la salute pubblica negli impianti di produzione alimentare poiché si ha la virtuale impossibilità di eliminare definitivamente il problema. Oltre alla difficoltà meccanica nel rimuovere il biofilm anche microscopici difetti nel materiale con cui sono costruite le superfici di lavoro rappresentano un ostacolo fisico a una disinfezione completa. Tuttavia anche la resistenza acquisita ai più comuni detergenti è un punto a cui bisogna prestare oramai una maggior attenzione (Pan, Breidt and Kathariou, 2006; Conficoni *et al.*, 2016).

Le strategie che derivano devono essere quindi mirate al controllo del microrganismo agendo sia su buone pratiche di pulizia e disinfezione sia, contestualmente, effettuando tamponi sulle superfici di lavoro per successive analisi laboratoristiche che attestino la reale efficacia di tali procedure (ILSI e Walls, 2005).

Delle raccomandazioni efficaci per le procedure di pulizia sono le seguenti:

- La concentrazione del disinfettante deve essere pari o superiore a quella raccomandata e la frequenza delle pulizie deve essere tale almeno da inibire la crescita di *L. monocytogenes* tra due pulizie consecutive.
- L'uso di acqua deve essere limitato nelle zone in cui il prodotto alimentare è esposto, le procedure di lavaggio e disinfezione devono essere seguite da una completa asciugatura delle superfici.
- Le superfici di lavoro devono essere pulite prima di essere disinfettate per togliere i residui organici e quindi per permettere di raggiungere la concentrazione efficace dell'agente disinfettante.
- Gli operatori devono ricevere adeguate istruzioni riguardo le operazioni di pulizia e disinfezione.

2.3 La genesi della flora microbica nel suino

2.3.1 MACELLAZIONE DEL SUINO

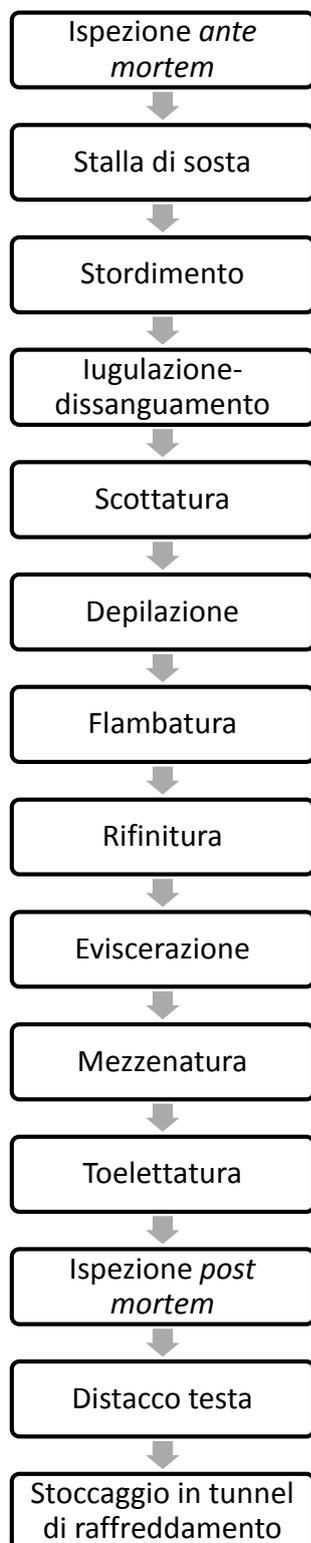


Figura 6: Fasi di macellazione del suino

La macellazione del suino è un processo altamente standardizzato, industrializzato e coinvolge un alto numero di operatori specializzati.

I maiali regolarmente macellati possono fungere da veicolo per la contaminazione delle carcasse da parte di *Listeria* spp. oppure subire la contaminazione in macello, dagli strumenti di lavoro o dagli operatori.

Le varie fasi del processo di macellazione sono illustrate in figura 6.

Dopo il trasporto dall'allevamento di origine i maiali trascorrono del tempo in stalla di sosta, all'arrivo del camion il veterinario ufficiale ASL effettua una visita ispettiva *ante mortem* con il controllo della documentazione e dello stato di salute degli animali.

Superata questa fase gli animali vengono avviati allo stordimento che può essere effettuato con varie metodiche: metodi meccanici (pistola a proiettile captivo penetrante e arma a proiettile libero), metodi elettrici (elettronarcosi ed elettrocuzione), metodi di esposizione a gas (biossido di carbonio ad alte o basse concentrazioni). Lo scopo dello stordimento consiste in una rapida perdita di coscienza e di sensibilità dell'animale, perdita dei riflessi ma permanenza di respirazione e circolazione sanguigna. Lo stordimento è uno stato transitorio la cui durata varia a seconda del metodo utilizzato.

In seguito allo stordimento deve essere effettuata rapidamente la iugulazione dell'animale in modo da portarlo a morte il più velocemente possibile evitando inutili sofferenze. Questa fase viene effettuata recidendo la vena giugulare e l'arteria carotide e portando a morte l'animale per collasso cardio-respiratorio in pochi secondi poiché il maiale perde rapidamente una grande quantità di sangue circolante andando incontro a *shock* ipovolemico.

A questo punto il maiale subisce un processo di scottatura con acqua di lavaggio tramite immersione in vasche con una temperatura dell'acqua di 60-65 °C per un periodo di 6-8 min. In questa fase la carcassa viene pulita dall'azione meccanica dell'acqua e la flora microbica superficiale diminuisce a causa dell'alta temperatura.

La depilazione della carcassa del suino viene effettuata tramite appositi macchinari che consistono di rulli rotanti dotati di spatole abrasive che rimuovono le setole e lo strato epidermico della cotenna.

In seguito viene eseguita la flambatura che consiste nell'applicazione di fiamma a 800-900 °C per 10-15 s sulla superficie della cotenna in modo da bruciare le setole più piccole oppure quelle sfuggite al passaggio precedente. La carcassa dopo questo passaggio viene ulteriormente pulita in modo da togliere i residui di setola bruciati nel passaggio precedente.

Successivamente il maiale viene eviscerato prestando la massima attenzione a non forare l'intestino e lo stomaco per non disseminare il contenuto fecale sulla carcassa. L'eviscerazione viene effettuata tramite incisione ischio-pubica quindi dalla zona di attacco delle cosce si arriva alla parte alta dello sterno. Vengono tolti l'intestino, lo stomaco, la vescica, l'utero se femmina, il pene e il canale uretrale se maschio. Queste parti sono destinate al reparto budelleria e in seguito destinate allo smaltimento in categoria 2. In questo momento viene effettuata anche l'asportazione della corata costituita da fegato, milza, polmoni, cuore esofago e lingua. Queste parti possono essere destinate al consumo umano oppure essere trasferite in categoria 3.

La fase che segue prevede la divisione della carcassa in due mezzene seguendo l'asse longitudinale della colonna vertebrale dal bacino allo sterno. La divisione in mezzene viene eseguita con una sega che si pulisce automaticamente tra una carcassa e l'altra.

Viene quindi svolta una toelettatura che consente di rimuovere i pezzi di carne e ossa derivanti dalla mezzenatura.

A questo punto il Veterinario Ufficiale ASL effettua l'ispezione *post mortem* della carcassa e della corata e decide se possano essere destinati al consumo umano oppure no.

L'ultima fase di macellazione consiste nel distacco della testa dalla carcassa effettuando un taglio appena caudale le orecchie in modo da disarticolare l'articolazione atlanto-occipitale. In questo modo la carcassa può passare in tunnel di raffreddamento oppure essere stoccata in cella frigorifera per le successive lavorazioni nel laboratorio di sezionamento.

2.3.2 PUNTI CRITICI DURANTE LA MACELLAZIONE

Numerosi pericoli possono presentarsi durante la macellazione dei maiali ed essenzialmente essi sono composti da pericoli biologici ovvero da microrganismi patogeni. Il flusso di macellazione è lineare e ben standardizzato, inoltre ogni punto è conosciuto e analizzato nel piano di *Hazard Analysis Critical Control Point* (HACCP) aziendale. In altre parole, tutto quello che viene svolto durante l'ambiente di lavoro è regolarizzato dal piano di autocontrollo quindi per ogni pericolo esiste un'azione preventiva oppure un piano di gestione nel caso in cui tale *hazard* riesca ad oltrepassare il controllo.

Fasi macellazione	Aspetti igienici	Azioni correttive
Stalla di sosta	Contaminazione tra animali	Lavaggio e disinfezione
Iugulazione	Contaminazione dai coltelli	Lavaggio e disinfezione
Scottatura	Riduzione della carica batterica	Tempo e temperatura
Depilazione	Contaminazione dalla macchina	Lavaggio e disinfezione
Flambatura	Riduzione della carica batterica	Tempo e temperatura
Rifinitura	Contaminazione dalla macchina	Lavaggio e disinfezione
Eviscerazione	Contaminazione da: intestino, lingua, faringe, tonsille, coltelli	Chiusura del retto, operatore formato, lavaggio dei coltelli
Mezzenatura	Contaminazione dalla macchina di taglio	Velocità di macellazione diminuita, alta temperatura dell'acqua
Ispezione <i>post mortem</i>	Contaminazione dall'ispezione	Lavaggio dei coltelli
Distacco della testa	Contaminazione dalla testa	Operatore formato, lavaggio dei coltelli

Tabella 5: Aspetti igienici e azioni correttive rispetto ai pericoli batterici durante la macellazione del suino. Fonte: Borch, Nesbakken e Christensen, (1996).

Risulta evidente che la contaminazione batterica può avvenire in ogni punto della catena di macellazione se non vengono eseguite azioni preventive. I batteri possono derivare dagli animali, dall'ambiente di lavorazione, dagli strumenti usati e dagli operatori. Nel caso specifico di *Listeria spp.* è chiaro che il controllo della contaminazione risulta molto difficile perché:

- Resiste alle alte temperature, si elimina solo con un'effettiva pastorizzazione;
- È ubiquitaria pertanto la contaminazione può avvenire in qualsiasi punto;
- Resiste alle basse temperature pertanto replica in tunnel di raffreddamento;
- Può derivare dal contenuto intestinale oppure dalla cavità orale dei suini;
- Resiste alle procedure di pulizia e disinfezione.

2.3.3 FLORA MICROBICA SUPERFICIALE DEL SUINO

Il microbiota cutaneo del suino è poco studiato però oggetto di ricerche recenti poiché considerato un modello per il microbiota cutaneo umano. Hoffmann, (2017) ha dimostrato che la popolazione microbica fisiologicamente residente sulla cute del padiglione auricolare del suino è composta prevalentemente dal *phylum Firmicutes* di cui i generi *Streptococchi* e *Lattobacilli* sono quelli più rappresentati, nelle cavità nasali il *phylum Proteobacteria* con il genere più rappresentato da *Moraxella* e che i suinetti hanno una flora microbica più diversificata rispetto ad animali adulti

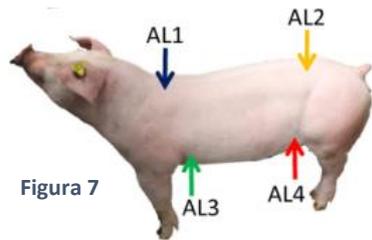


Figura 7

McIntyre e coll., (2016) hanno effettuato 4 tamponi sulla cute di suini come espresso in figura 7. La famiglia di batteri più frequentemente coinvolta è *Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*.

Molti batteri patogeni sono presenti sulla cute del suino. Lindblad e coll., (2007) hanno eseguito dei tamponi su quattro punti della carcassa: coscia, schiena, pancia e collo per una superficie totale di 400 cm². Si sono in seguito identificati i seguenti microrganismi come mostrato in figura 8.

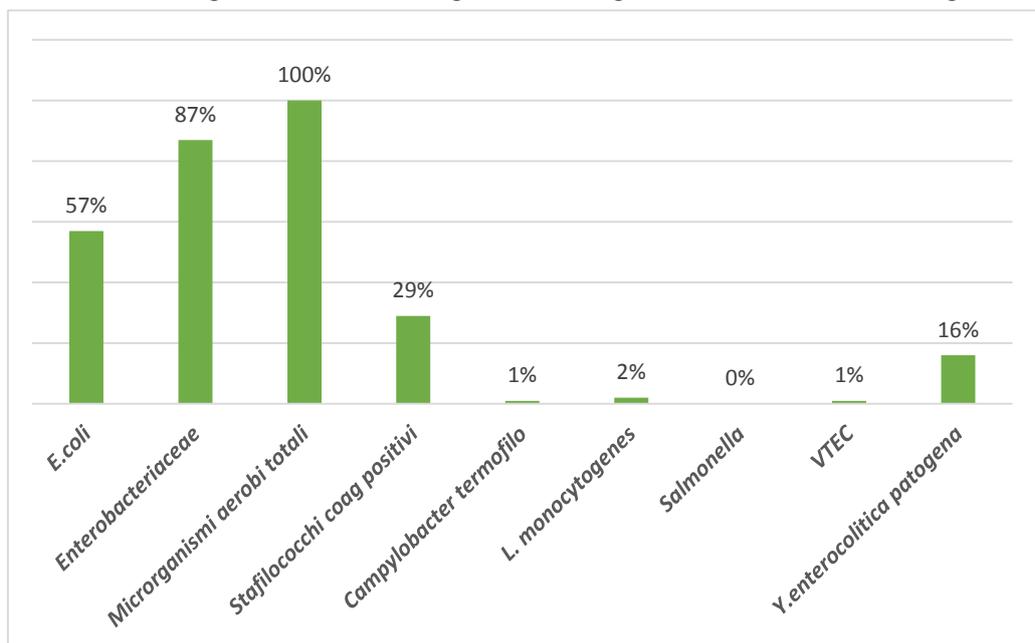


Figura 8: Prevalenza di microrganismi sulle carcasse di suini. Fonte: Lindblad *et al.*, (2007)

Uno studio di questo tipo evidenzia la diversità e la prevalenza di microrganismi patogeni sulla cute dei suini ma non si concentra invece su quali parti anatomiche (coscia, schiena, pancia e collo) siano più contaminate.

Nella ricerca svolta da O'Brien e coll., (2007) si confrontano due metodi di campionamento: il primo è

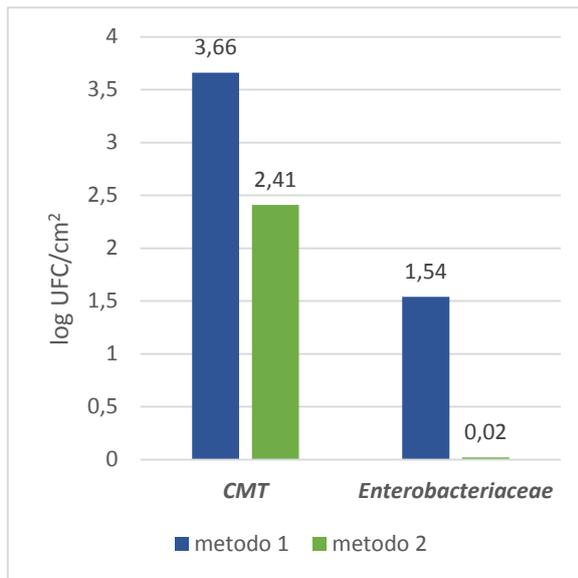


Figura 9: Media della conta log di UFC per cm² di CMT ed *Enterobacteriaceae* con (1) tamponi su quattro zone e (2) tampone su tutta la carcassa. Fonte: O'Brien *et al.*, (2007)

basato su quattro punti anatomici della carcassa ovvero coscia, schiena, pancia e collo; il secondo invece si basa su un unico tampone su tutta la carcassa. Il primo metodo raccomandato dalla direttiva della commissione europea 471 del 2001 prende come batteri di riferimento per l'igiene alla macellazione la CMT (carica microbica totale) e le *Enterobacteriaceae*. Dai risultati (vedi figura 9) è emerso come la prevalenza di questi microrganismi sia diversa dal primo metodo al secondo poiché il tampone eseguito su tutta la carcassa tende a prelevare meno batteri tendendo ad ottenere una media di batteri isolabili dai siti con alta e bassa contaminazione. I quattro siti campionati, invece, rappresentano zone maggiormente sporche, quindi confrontando i metodi si ha una maggior prevalenza di batteri con il primo metodo rispetto al secondo.

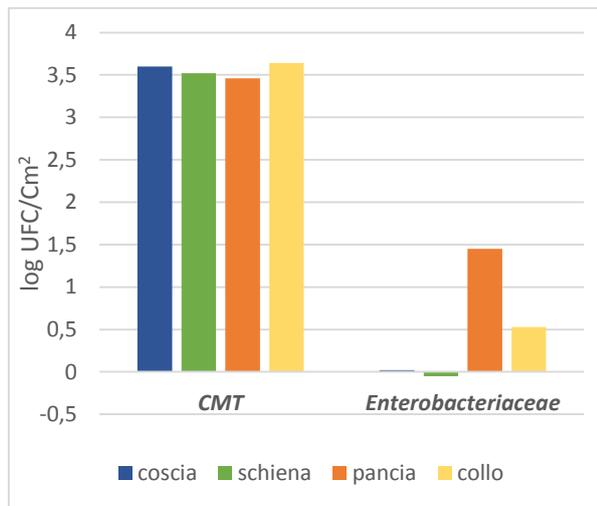


Figura 10: Media della conta log di UFC per cm² di CMT ed *Enterobacteriaceae* dalla coscia, schiena, pancia e collo delle carcasse di suino. Fonte: : O'Brien *et al.*, (2007).

Questo studio evidenzia anche una diversa localizzazione spaziale delle *Enterobacteriaceae* (figura 10) con le zone più contaminate rappresentate dalla pancia e dal collo dei suini.

Per quanto riguarda *Listeria monocytogenes* numerosi studi sono stati eseguiti al macello con il rilievo tramite tamponi dalla superficie esterna della carcassa però nessuno ha evidenziato una diversa localizzazione spaziale tra le varie parti anatomiche e solo pochi studi si concentrano sulla contaminazione di *Listeria* spp. Il grosso problema risiede nel fatto che questi studi sono stati svolti

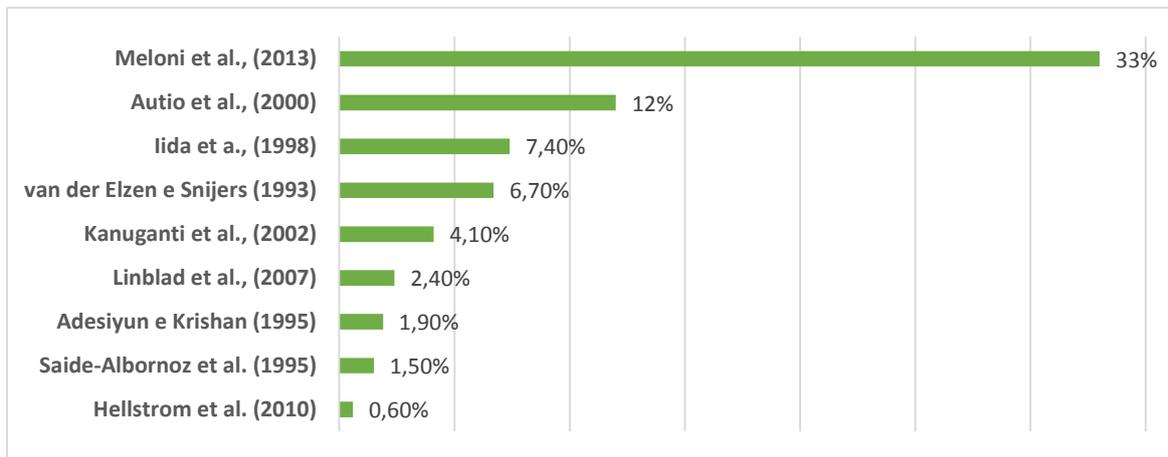


Figura 11: Prevalenza di *L. monocytogenes* sulle carcasse di suino

senza una reale standardizzazione quindi in taluni viene campionata una superficie di 40 cm², in altri una superficie di 100 cm² e anche le metodiche di laboratorio seguono procedure e materiali diversi da studio a studio. Tuttavia si sono svolte molte ricerche con un numero anche consistente di campioni. Si faccia riferimento alla figura 11. Come si può notare dal grafico, si ha una notevole differenza per la positività percentuale di *L. monocytogenes* sulle carcasse che nel caso dello studio svolto da Meloni e coll., (2013), ha toccato la prevalenza del 33%.

Molti autori si interrogano sull'origine di questa contaminazione della carcassa da parte di *L. monocytogenes*. Taluni suggeriscono che la genesi di questa flora microbica derivi dal contenuto intestinale dei suini e che ci possa essere una contaminazione sia in allevamento sia al momento della macellazione. Altri autori propendono per l'ipotesi di una contaminazione batterica in macello con gli strumenti utilizzati visto che i batteri rinvenuti sulla carcassa sono geneticamente diversi da quelli presenti nelle feci. Le opinioni sono contrastanti e i risultati ottenuti molto spesso contraddicono quanto era stato affermato nello studio precedente. Tuttavia gli autori sono concordi nell'affermare che il rinvenimento di qualsiasi specie di *Listeria* nel cibo è un segno di cattiva igiene dell'impianto poiché *Listeria spp.* è ubiquitaria (McLauchlin, 1997).

2.3.4 FLORA MICROBICA DELLE FECI DEL SUINO

La normale flora microbica intestinale del suino è composta dalla totalità dei microrganismi (batteri, virus, protozoi) con un ruolo positivo sulla salute dell'animale. Il microbiota descrive la totalità di questi microrganismi, mentre il microbioma descrive i loro elementi genetici e le interazioni con l'ambiente. (Kim ed Isaacson, 2015) L'importante ruolo che possiede questa comunità microbica negli animali non è ancora ben chiaro e probabilmente può regolare funzioni extraintestinali che ancora non si riescono ad individuare. Una delle funzioni più importanti a livello intestinale di questi microrganismi è certamente quella di degradazione dei macronutrienti non digeribili come i polisaccaridi (cellulosa ed emicellulosa). Altre funzioni del microbiota intestinale sono il riciclo degli acidi biliari, la produzione di vitamina K e la produzione di fosfatasi alcalina. Il microbioma intestinale è anche uno stimolo alla maturazione del sistema immunitario a livello locale e funge da antagonista competitivo nei confronti della colonizzazione e invasione di batteri patogeni.

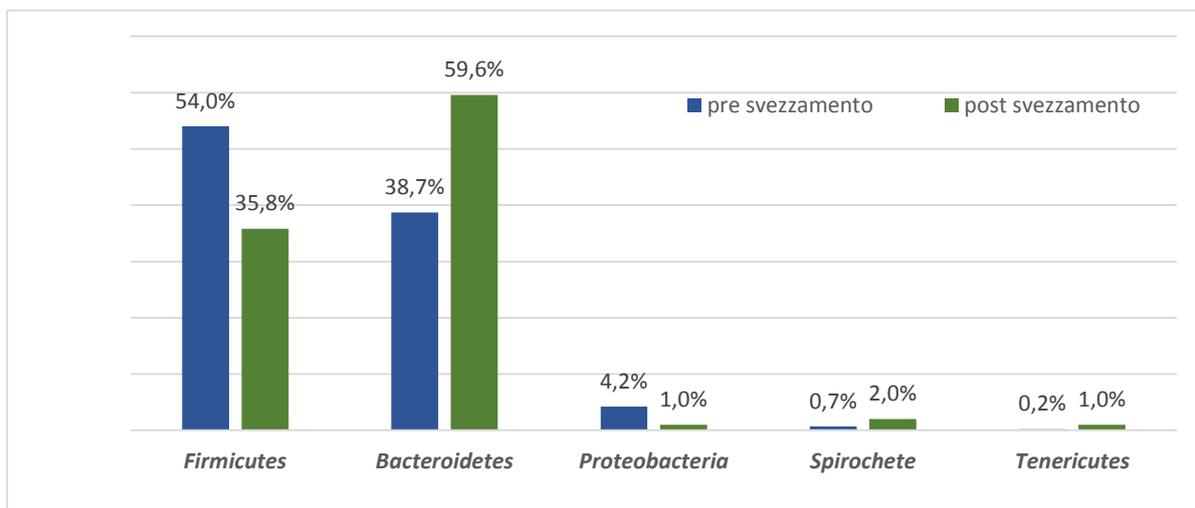


Figura 12: Cambiamento del microbioma intestinale suino pre e post svezzamento. Fonte: Kim e Isaacson, (2015).

Questa comunità polimicrobica è dinamica perché i microrganismi presenti cambiano di numero e di genere al passare del tempo fino a raggiungere una comunità stabile. Tale passaggio è influenzata da numerosi fattori e il più importante è l'assunzione di cibo solido durante lo svezzamento. Un altro punto importante è la diversità microbica nell'anatomia intestinale: nell'ileo il *phylum* predominante è rappresentato da *Firmicutes* e a livello di cieco e colon sono molto presenti i *phyla Firmicutes* e *Bacteroidetes* senza significative differenze tra i due siti anatomici (Kim e Isaacson, 2015).

Il suino tuttavia può essere eliminatore nelle feci di alcuni batteri che provocano zoonosi come *E. coli*, *Yersinia spp.*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*. Il ruolo del suino come eliminatore è ben documentato e rappresenta un rischio perché, non manifestando segni clinici, può essere macellato senza sospetti. D'altronde le feci rappresentano un rischio anche per gli ambienti

agricoli perché vengono sparse sui campi per concimare e la dispersione di tali batteri rappresenta una fonte di inquinamento sia per le colture agricole sia per le falde acquifere.

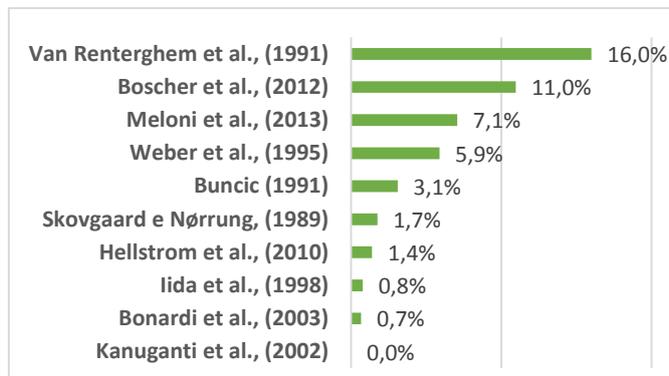


Figura 13: Prevalenza di *L. monocytogenes* nelle feci di suini macellati.

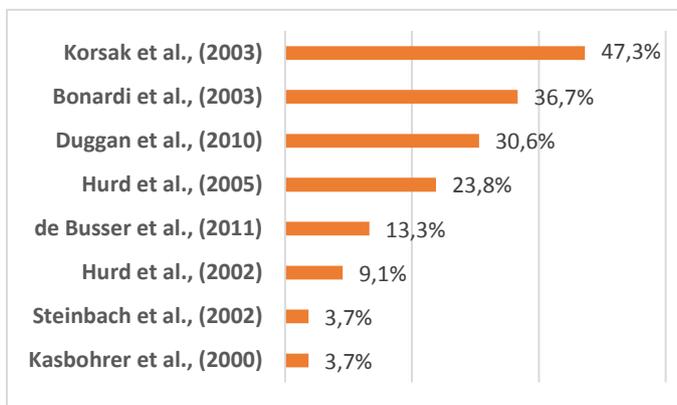


Figura 14: Prevalenza di *Salmonella* spp. nelle feci di suini macellati.

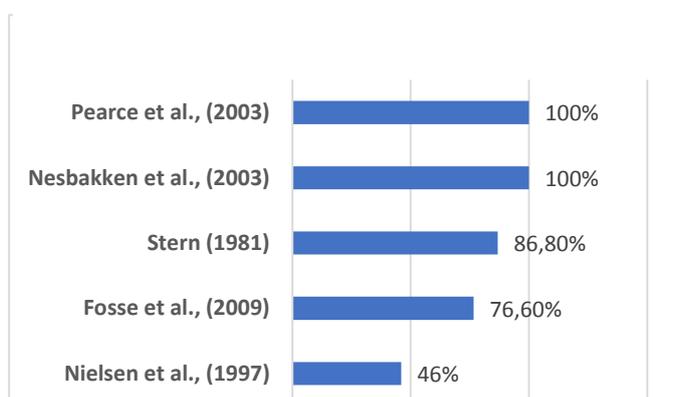


Figura 15: Prevalenza di *Campylobacter* spp. nelle feci di suini macellati.

Da questi dati si può notare come sia ben documentata la presenza di batteri patogeni nelle feci di suini sani arrivati al macello. La prevalenza varia a seconda del microrganismo coinvolto: *Campylobacter* spp. è il batterio più presente e molte volte viene identificato nella totalità dei campioni esaminati. *Salmonella* spp. è anch'essa presente anche se con minori prevalenze e *Listeria monocytogenes* è il patogeno meno presente.

Anche se *Listeria monocytogenes* è poco presente nelle feci, è ampiamente disseminato nell'ambiente di lavoro e riesce in taluni casi a raggiungere cariche elevate nel prodotto finale. Fenlon e Donachie, (1996) ritengono che la contaminazione del prodotto finale possa avvenire in vari momenti e che non sia necessariamente correlata con la presenza di *Listeria monocytogenes* a livello fecale. Kanuganti e coll., (2002) hanno identificato infatti *Listeria monocytogenes* meno frequentemente nei tessuti freschi e nel piccolo intestino rispetto alla carne lavorata di suino. Tale riscontro suggerisce come siano importanti i processi produttivi nella contaminazione delle carni.

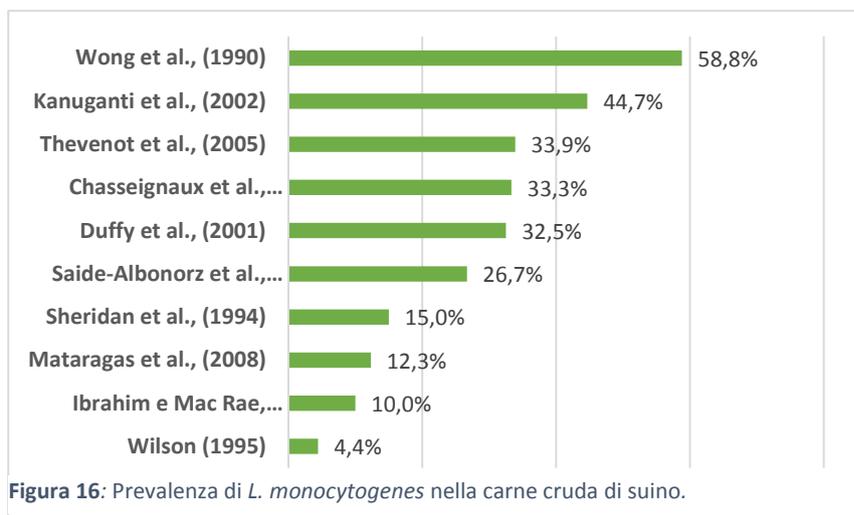
2.3.5 PREVALENZA DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* NELLE CARNI DI MAIALE

La carne rappresenta una matrice di crescita ideale per molti microrganismi sia patogeni che alteranti.

In particolare la carne suina può trasmettere zoonosi batteriche sostenute da *Salmonella* spp., *E. coli* verocitotossici, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp. e zoonosi parassitarie come *Toxoplasma gondii* e *Trichinella* spp..

La crescita dei batteri viene favorita in una matrice che abbia un pH vicino alla neutralità, un'attività dell'acqua libera elevata, una temperatura tra i 25-40 °C e una quantità di micro e macro-elementi utili per la moltiplicazione cellulare. La carne cruda soddisfa tutte queste condizioni ed è chiaro come il suo ruolo nella salute pubblica sia di primaria importanza.

Nel caso specifico di *Listeria* dalla figura 16 si può notare come la prevalenza nella carne sia molto



elevata. Il fatto non deve sorprendere poiché da una parte la carne si può contaminare dal contenuto fecale ma dall'altra si contamina anche durante le operazioni di macellazione e di sezionamento. In particolare la

contaminazione iniziale delle carni può avvenire durante l'estrazione della corata poiché lingua e tonsille risultano essere contaminate rispettivamente nel 14% e il 12% dei casi (Autio *et al.*, 2000). Tuttavia a seconda del tipo di campionamento, la prevalenza di *L. monocytogenes* nelle tonsille varia dal 0% al 61% (Fenlon e Donachie, 1996).

Nelle successive lavorazioni *Listeria* spp. può moltiplicare e sopravvivere sulla carne perché le temperature che si raggiungono con la refrigerazione non ostacolano la crescita di questo microrganismo a differenza di molti altri patogeni. Nel laboratorio di sezionamento aumenta ancora la superficie disponibile per i batteri e ciò rappresenta un rischio maggiore di disseminazione di *Listeria* spp. nelle carni lav

Capitolo 3

Parte Sperimentale

3.1 Materiali

3.1.1 RACCOLTA DEI CAMPIONI

Nel corso di questa ricerca sono stati analizzati in totale 450 campioni ricavati da 150 suini per la ricerca di *Listeria spp.* sulla carcassa. Per ogni carcassa sono stati effettuati tre tamponi: uno sulla superficie esterna della coscia, uno sulla superficie esterna del lombo-spalla e uno sulla superficie esterna della testa. L'ipotesi presunta era infatti che sulla testa ci fosse un accumulo di microrganismi maggiore rispetto ad altre zone, considerando le modalità di macellazione, la iugulazione, la posizione della testa e la presenza del cavo orale.

I tamponi sono stati effettuati in un macello della provincia di Padova in un arco temporale compreso tra il 21 Marzo e il 20 Giugno 2017 al fine ridurre l'effetto stagionale sui risultati. I suini campionati sono stati raggruppati a *cluster* di 9-10 a seconda del lotto di provenienza per un totale di 15 lotti. Per ogni giornata in macello si sono campionati 10 animali per lotto per un totale di 3 lotti a giornata. Durante il primo giorno tuttavia sono stati effettuati tamponi su 9 animali nel lotto A e su 11 animali nel lotto B perché i maiali macellati del lotto A non erano più disponibili in catena di macellazione. Non si sono effettuati ulteriori campioni perché raggiunto il numero di 150 maiali si è raggiunta una significatività statistica.

I tamponi sono stati effettuati tramite *sponge-bag*, ossia tramite spugnette sterili imbevute di 10 ml di soluzione fisiologica sterile e chiuse ermeticamente da un sacchetto di nylon (vedi figura 17). Per la numerazione dei campioni si è scelto di indicare un numero e una lettera: il numero rappresenta l'animale e la lettera rappresenta la parte anatomica campionata (T= testa, S= spalla, C= coscia). La superficie da campionare era di 400 cm² per la coscia e il lombo-spalla cadauna e indicativamente tutta la superficie della testa (splancnocranio) comprensiva della superficie interna del padiglione auricolare (vedi figura 18 e 19). I campioni sono stati effettuati nella maniera sterile, evitando cross-contaminazioni.



Figura 17

I campioni sono stati prelevati durante la macellazione tra la fase di applicazione del FOM (*Fat-O-Meater*), ossia dopo la fase in cui viene misurata la percentuale di grasso alla coscia, e quella del distacco della testa dalla mezzena.

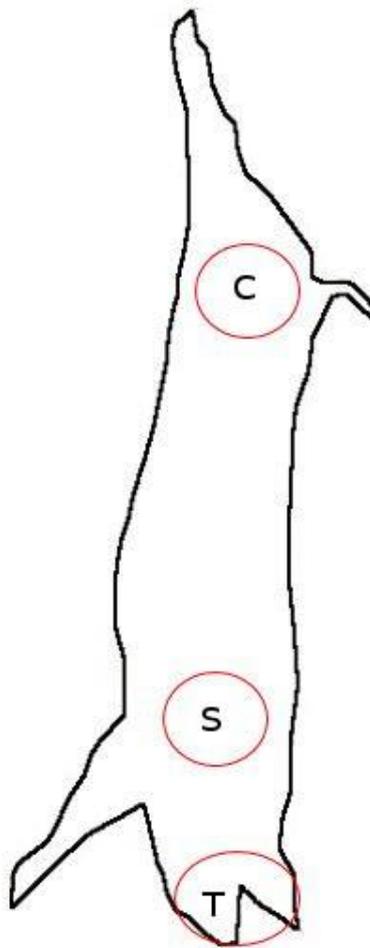


Figura 18: Prelievo sulla superficie della carcassa suina.



Figura 19: Prelievo dei campioni tramite tamponi sulla superficie di coscia (1), lombo-spalla (2,3) e testa (4).

Dopo il prelievo i campioni sono stati riposti in una borsa termica dotata di dispositivi refrigeranti e sono state recuperate le informazioni relative al lotto:

1. La provenienza dei maiali;
2. Il tipo di pavimentazione dell'allevamento;
3. Il sesso degli animali allevati;
4. La tipologia di allevamento (intensivo o biologico);
5. Il ciclo di allevamento (aperto o chiuso);
6. L'alimentazione (umido o secco);
7. La razza allevata;
8. Il tempo medio trascorso in stalla di sosta;
9. La distanza dal macello.

Di queste informazioni tuttavia, solo alcune sono state prese in considerazione poiché ritenute significative. Le altre informazioni richieste come il tipo di alimentazione e il sesso allevato non influiscono sull'indagine poiché tutti i lotti sono risultati omogenei per quanto riguarda l'informazione su pavimentazione, sesso, tipologia di allevamento, razza e alimentazione.

I campioni sono stati trasportati in laboratorio di Ispezione degli Alimenti del dipartimento MAPS (Medicina Animale, Produzioni e Salute) presso la Scuola di Agraria e Medicina Veterinaria di Legnaro (PD) e registrati secondo i seguenti criteri:

- Numero di laboratorio;
- Data;
- Identificativo del campione;
- Lotto di provenienza.

Segue un esempio riguardante i primi due lotti.

Id laboratorio	Data	Id campione	Provenienza	Lotto	Id laboratorio	Data	Id campione	Provenienza	Lotto
408	21/03/2017	1 T	Istrana (TV)	A	435	21/03/2017	10 T	Soncino (CR)	B
409	21/03/2017	1 S	Istrana (TV)	A	436	21/03/2017	10 S	Soncino (CR)	B
410	21/03/2017	1 C	Istrana (TV)	A	437	21/03/2017	10 C	Soncino (CR)	B
411	21/03/2017	2 T	Istrana (TV)	A	438	21/03/2017	11 T	Soncino (CR)	B
412	21/03/2017	2 S	Istrana (TV)	A	439	21/03/2017	11 S	Soncino (CR)	B
413	21/03/2017	2 C	Istrana (TV)	A	440	21/03/2017	11 C	Soncino (CR)	B
414	21/03/2017	3 T	Istrana (TV)	A	441	21/03/2017	12 T	Soncino (CR)	B
415	21/03/2017	3 S	Istrana (TV)	A	442	21/03/2017	12 S	Soncino (CR)	B
416	21/03/2017	3 C	Istrana (TV)	A	443	21/03/2017	12 C	Soncino (CR)	B
417	21/03/2017	4 T	Istrana (TV)	A	444	21/03/2017	13 T	Soncino (CR)	B
418	21/03/2017	4 S	Istrana (TV)	A	445	21/03/2017	13 S	Soncino (CR)	B
419	21/03/2017	4 C	Istrana (TV)	A	446	21/03/2017	13 C	Soncino (CR)	B
420	21/03/2017	5 T	Istrana (TV)	A	447	21/03/2017	14 T	Soncino (CR)	B
421	21/03/2017	5 S	Istrana (TV)	A	448	21/03/2017	14 S	Soncino (CR)	B
422	21/03/2017	5 C	Istrana (TV)	A	449	21/03/2017	14 C	Soncino (CR)	B
423	21/03/2017	6 T	Istrana (TV)	A	450	21/03/2017	15 T	Soncino (CR)	B
424	21/03/2017	6 S	Istrana (TV)	A	451	21/03/2017	15 S	Soncino (CR)	B
425	21/03/2017	6 C	Istrana (TV)	A	452	21/03/2017	15 C	Soncino (CR)	B
426	21/03/2017	7 T	Istrana (TV)	A	453	21/03/2017	16 T	Soncino (CR)	B
427	21/03/2017	7 S	Istrana (TV)	A	454	21/03/2017	16 S	Soncino (CR)	B
428	21/03/2017	7 C	Istrana (TV)	A	455	21/03/2017	16 C	Soncino (CR)	B
429	21/03/2017	8 T	Istrana (TV)	A	456	21/03/2017	17 T	Soncino (CR)	B
430	21/03/2017	8 S	Istrana (TV)	A	457	21/03/2017	17 S	Soncino (CR)	B
431	21/03/2017	8 C	Istrana (TV)	A	458	21/03/2017	17 C	Soncino (CR)	B
432	21/03/2017	9 T	Istrana (TV)	A	459	21/03/2017	18 T	Soncino (CR)	B
433	21/03/2017	9 S	Istrana (TV)	A	460	21/03/2017	18 S	Soncino (CR)	B
434	21/03/2017	9 C	Istrana (TV)	A	461	21/03/2017	18 C	Soncino (CR)	B
					462	21/03/2017	19 T	Soncino (CR)	B
					463	21/03/2017	19 S	Soncino (CR)	B
					464	21/03/2017	19 C	Soncino (CR)	B
					465	21/03/2017	20 T	Soncino (CR)	B
					466	21/03/2017	20 S	Soncino (CR)	B
					467	21/03/2017	20 C	Soncino (CR)	B

3.1.2 TERRENI DI COLTURA

I terreni utilizzati per la ricerca qualitativa di *Listeria spp.* dai tamponi sono i seguenti: HFB (*Half Fraser Broth*); ALOA (*Agar Listeria Ottaviani Augusti*); PCA (*Plate Count Agar*).

1. **HFB** è un brodo di pre-arricchimento selettivo utilizzato durante il primo giorno di campionamento per fare raggiungere a *Listeria spp.* una numerosità tale nel campione da poter essere identificata. Per preparare HFB si è utilizzato un volume di 500 ml di acqua distillata in cui viene aggiunto 27,5 g di terreno in polvere *Listeria Half Fraser Broth*. Si mescola e si porta ad ebollizione fino a quando la polvere del terreno si scioglie completamente e si sterilizza in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Passato questo tempo si raffredda a temperatura



Figura 20: Annerimento del HFB in testa e spalla dello stesso maiale, scarso annerimento in coscia.

inferiore a 50 °C. Contemporaneamente si aggiunge 1 ml di acqua distillata sterile al flacone di *Selective Supplement* e al flacone di *Ammonium Iron III Citrate*. I flaconi così ottenuti si aggiungono al mezzo litro di *Half Fraser Broth* mescolando attentamente. Si lascia raffreddare e si conserva in frigorifero a una temperatura di 2-8°C per una settimana. Il brodo ottenuto ha un colore giallo paglierino e in presenza di *Listeria spp.* diventa di colore nero perché il genere *Listeria* idrolizza l'esculina in escutelina. L'escutelina reagisce con gli ioni ferrici portando ad annerimento del campione. HFB è una modificazione di *Fraser Broth* poiché contiene una concentrazione dimezzata di acido nalidixico e acriflavina e ciò aiuta nel rivitalizzare i batteri stressati.

2. **ALOA** (*Agar Listeria Ottaviani Augusti*) è un terreno selettivo, cromogeno e differenziale per la determinazione ed il conteggio di *Listeria monocytogenes* negli alimenti ed in altri campioni. Per preparare questo terreno si sospendono 35,3 g in 500 ml di acqua distillata e si porta ad ebollizione fino a completo scioglimento. Si sterilizza in autoclave a 121 °C per 15 minuti e si raffredda a 50 °C aggiungendo a questo punto il contenuto di una fiala di ALOA da 20 ml di *Enrichment Supplement*, contenente 1 g di L- α -fosfatidilinositolo, preriscaldato a 48-50°C ed il contenuto di una fiala di *ALOA Selective Supplement* (composto da acido nalidixico 10 mg, ceftazimide 10 mg, cicloeximide 50 mg, polimixina B 38350 UI) ricostituito con 5 ml di una miscela alcool etilico/acqua distillata sterile (1:1) mescolando attentamente. Si procede quindi con la distribuzione dell'agar ancora liquido dentro piastre Petri sterili sotto cappa per garantire la sterilità e si conserva a una temperatura di 2-8 °C per un tempo massimo di una

settimana. In piastra il terreno ALOA appare di colore giallo chiaro opalescente. L'azione

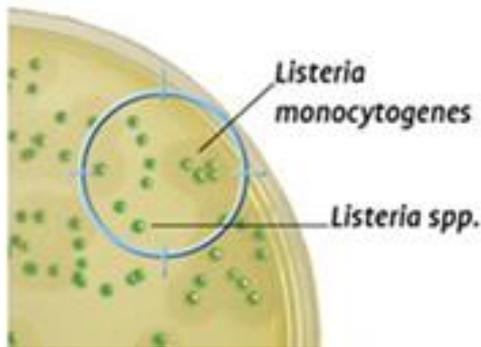


Figura 21: Differenze tra colonie di *Listeria spp.* e *L. monocytogenes* in ALOA.

selettiva è dovuta alla presenza nel terreno di base del litio cloruro ed all'aggiunta della miscela antimicrobica del supplemento selettivo contenente ceftazidime, polimixina B, acido nalidixico e cicloeximide. L'azione differenziale è dovuta alla presenza nel terreno del composto cromogeno X-glucoside quale substrato per l'evidenziazione dell'enzima β -glucosidasi, comune a tutte le specie di *Listeria*. L'azione

differenziale specifica è ottenuta con un substrato specifico per la fosfolipasi C (PIPLC), propria della sola specie *L. monocytogenes* e di alcuni ceppi di *L. ivanovii*. Con l'azione combinata dei due substrati è possibile differenziare le seguenti colonie:

- *L. monocytogenes*: colonie verde-blu circondate da un alone opaco.
- *Listeria spp.* non *monocytogenes*: colonie verde-blu senza alone opaco.

3. **PCA** (*Plate Count Agar*) ossia *Tryptic Glucose Yeast Agar* è utilizzato come terreno di mantenimento e per la conta totale dei batteri aerobi ed anaerobi facoltativi eterotrofi. Per preparare questo terreno si sospendono 23,5 g di polvere in 1 L di acqua distillata fredda. Si porta ad ebollizione sotto agitazione fino a completo scioglimento dell'agar e si sterilizza in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Passato questo tempo si raffredda a una temperatura di 50 °C e si trasferiscono 4,5 ml di PCA in provette sterili sotto cappa. Le provette devono essere inclinate in modo da far assumere all'agar la caratteristica forma a "becco di clarino". Lo si lascia a raffreddare e si conserva in frigorifero a una temperatura di 2-8°C per una settimana.

3.2 Metodi

3.2.1 ANALISI MICROBIOLOGICHE

In laboratorio si è seguita la metodica colturale tradizionale qualitativa, lo scopo delle analisi è stato infatti dimostrare la presenza o meno di *Listeria* spp. su tre punti superficiali della carcassa. I campioni sono stati reidratati, seminati ed identificati tramite terreni di coltura specifici per *Listeria*. All'individuazione macroscopica su ALOA è seguita la conferma biochimica tramite metodo *Biolog* in un laboratorio esterno.

1. La prima fase (arricchimento selettivo) prevede l'aggiunta di 90 ml di HFB in ogni *spongebag* debitamente numerata. Questa operazione è stata svolta in sterilità lavorando in cappa biologica. Una volta completata questa fase, le *spongebag* contenenti HFB sono state incubate ad una temperatura di 31 °C per 24 h.
2. La seconda fase consiste nel controllo macroscopico delle *spongebag* imbevute di HFB. Esse, infatti, virano da giallo a nero in presenza di *Listeria* spp. Nell'operazione successiva si semina a quadranti il contenuto di ciascun sacchetto con anse sterili sulle piastre ALOA debitamente numerate e si incubano le piastre a 37 °C per 48 h.
3. A 24 h dall'incubazione si controlla la crescita nelle piastre di ALOA, nel caso di mancanza di crescita si re incubano per altre 24 h. Le colonie tipiche di *Listeria* spp., verdi-azzurre senza alone, e di *L. monocytogenes* (verdi-azzurre con alone) vengono prelevate con ansa sterile e trasferite su una provetta contenente PCA effettuando una prima semina sulla superficie esterna del terreno e una seconda semina per infissione. Le provette sono incubate a 37 °C per 24 h.
4. Le provette vengono quindi chiuse con il parafilm in modo da garantire una adeguata umidità del campione e refrigerate per poter essere spedite al laboratorio esterno che darà la conferma alla positività e la caratterizzazione di specie tramite metodica *Biolog*.

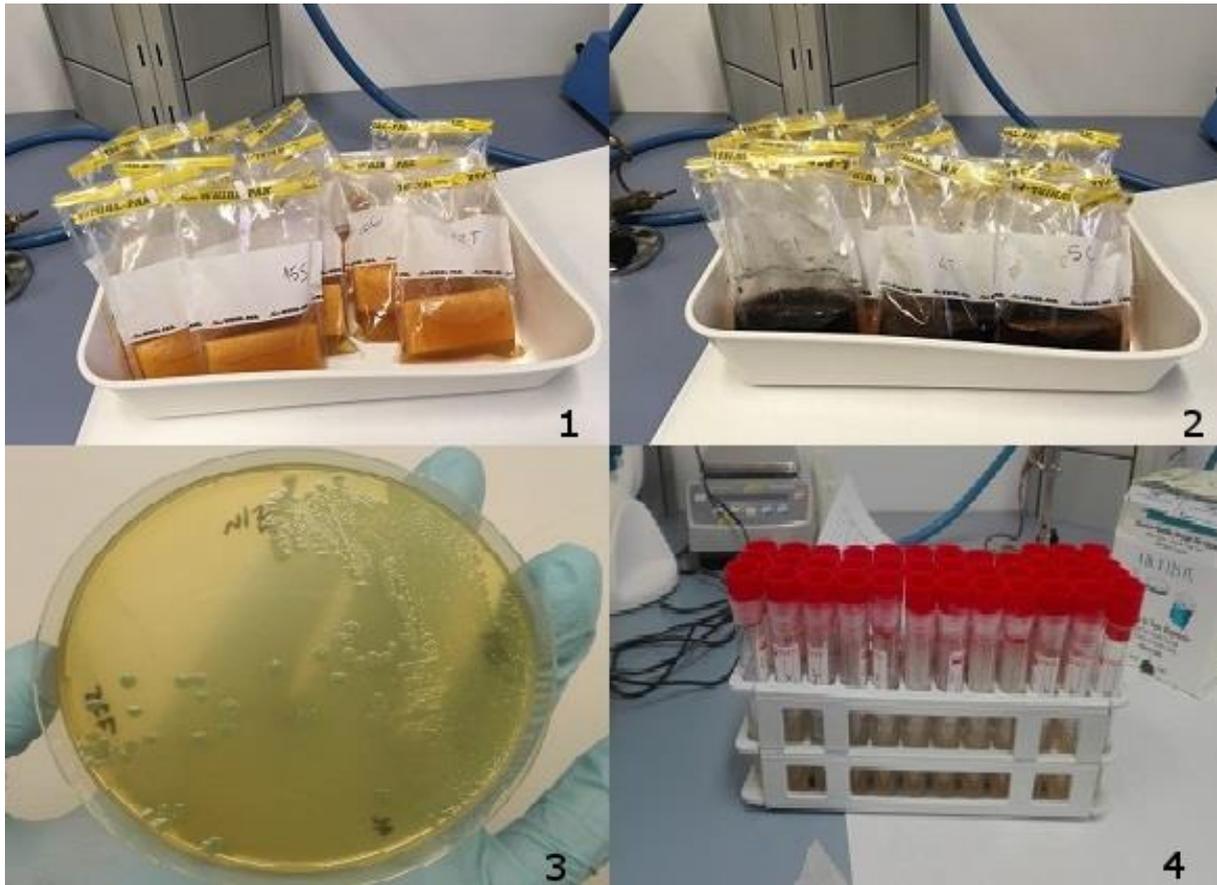


Figura 22: Fasi delle analisi in laboratorio: aggiunta di HFB alle *spongebag* (1), annerimento dei campioni e passaggio in ALOA (2), crescita in ALOA dopo 24 h (3), passaggio di colonie pure su provette di PCA pronte al trasferimento per il Biolog (4).

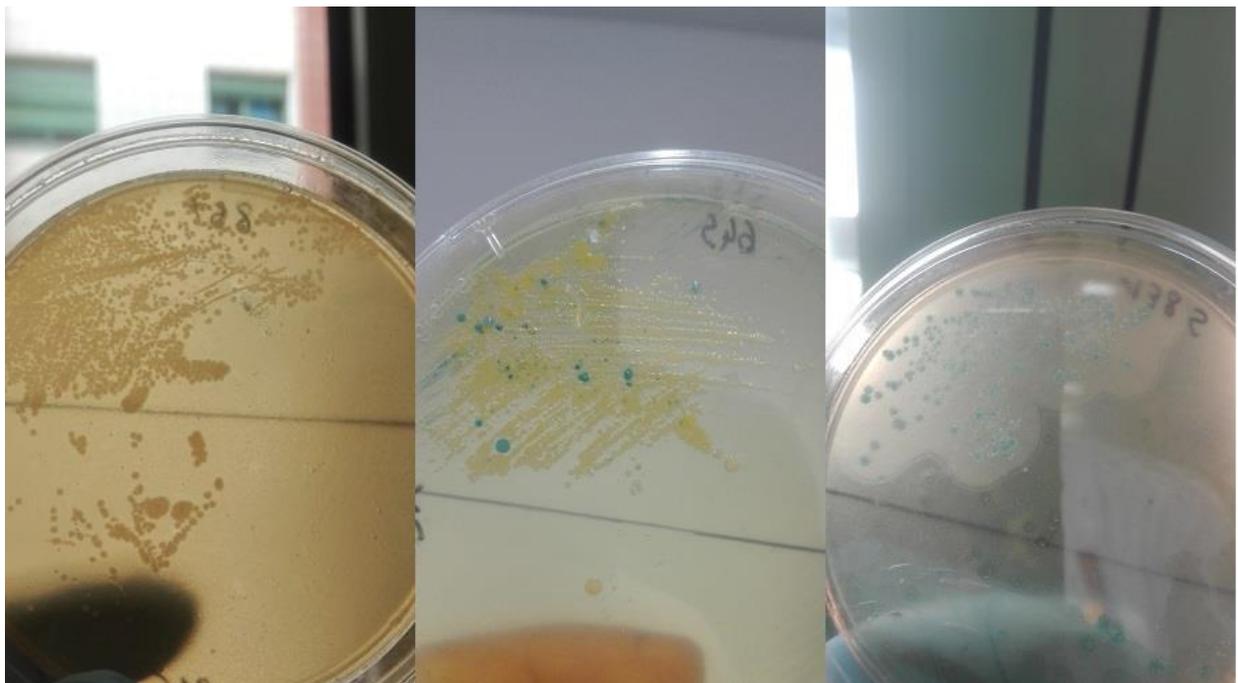


Figura 23: Diverse crescite su ALOA: negativo per *Listeria* spp., probabile *Bacillus* spp. (1); crescita mista e positivo per *Listeria* spp. (2); probabile *Listeria monocytogenes* (3).

3.2.2 BIOLOG MICROBIAL ID SYSTEM

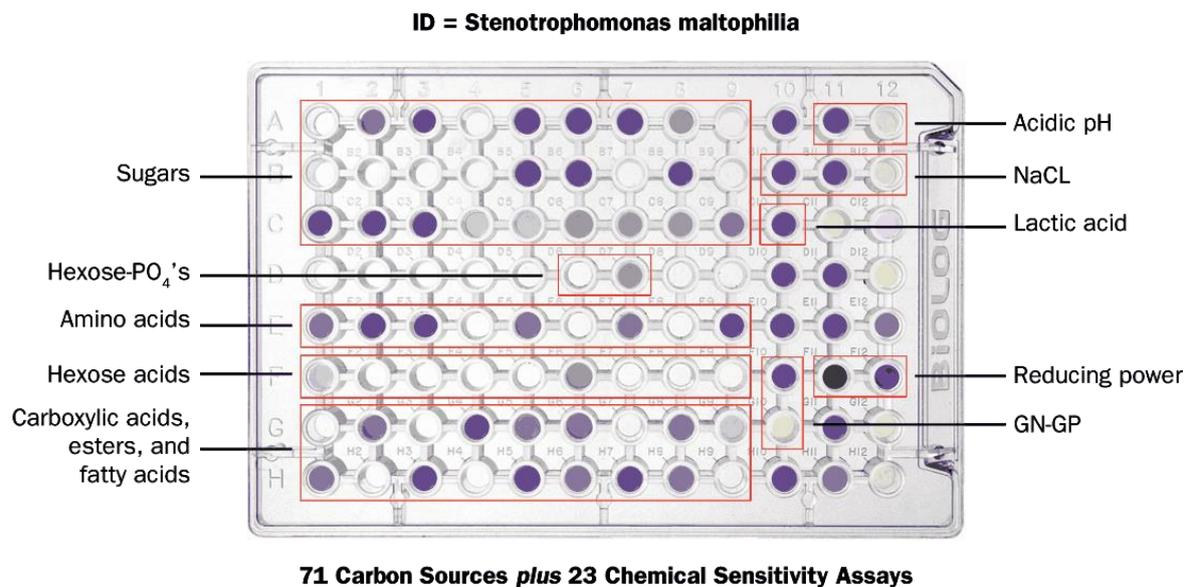


Figura 24: Biolog Gen III Plate. Fonte: www.biolog.com

Il *Biolog Microbial ID System* è una tecnica fenotipica che permette di identificare molti microrganismi. Si basa sulla reazione di ossidoriduzione rispetto a vari composti prodotta da un determinato genere e specie di batteri. Nella tesi svolta è stata richiesta questa ulteriore analisi per confermare quanto è emerso dall'analisi colturale. Infatti, recentemente, è stato dimostrato che sul terreno specifico per *Listeria* ALOA crescono anche altri batteri (*Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Kocuria kristinae*) con caratteristiche analoghe a *Listeria spp.* e *Listeria monocytogenes* i.e. l'alone di precipitazione dovuto alla fosfolipasi C (Angelidis *et al.*, 2015).

Il sistema Biolog è composto da piastre (*Biolog Gen III Plate*) che racchiudono varie reazioni chimiche che se positive assumono una colorazione violacea. Ogni piastra è composta da 94 pozzetti di cui 71 contengono sostanze con una fonte di carbonio (parte sinistra della piastra) e 23 pozzetti servono per la valutazione della tolleranza del batterio alle sostanze chimiche (parte destra).

I 71 pozzetti con la fonte di carbonio contengono:

- Zuccheri;
- Esossi fosfati;
- Amminoacidi;
- Esossi acidi;
- Acidi carbossilici, esteri e acidi grassi.

I test per la sensibilità chimica sono composti da:

- pH: tre pozzetti da sinistra a destra con pH 7, pH 6 e pH 5 rispettivamente;
- NaCl: tre pozzetti con concentrazione di NaCl di 1%, 4% e 8% da sinistra a destra rispettivamente;
- Acido lattico;
- Potere riducente;
- Reazione di Gram.



Figura 25: Procedimento per l'analisi biolog. Fonte: www.biolog.com.

Il procedimento si svolge in quattro fasi:

1. Isolamento: con un'ansa sterile si effettua il prelievo di una colonia pura;
2. Preparazione: la colonia viene stemperata in acqua distillata sterile e verificata la corretta densità
3. Inoculo: la soluzione contenente il microrganismo viene inoculata sulla piastra del biolog;
4. Incubazione e lettura: la piastra viene messa ad incubare e successivamente il computer legge il "codice" fenotipico derivante dalla metabolizzazione dei vari composti permettendo l'identificazione di genere e specie.

3.2.3 METODI STATISTICI DI ELABORAZIONE DEI DATI

Il programma utilizzato per il calcolo statistico è XLSTAT.

Il confronto tra k-proporzioni è un test che consente di confrontare varie popolazioni ed esprimere un giudizio del tipo: le popolazioni sono uguali o sono diverse?

Nel caso della tesi le popolazioni vengono inferite da un numero rappresentativo di campioni o proporzioni.

Le proporzioni in statistica vengono rappresentate con delle curve gaussiane che possono sovrapporsi e quindi rappresentare la stessa popolazione, oppure essere divise e intersecarsi in una piccola area rappresentata dal *p-value* e appartenere quindi a popolazioni diverse.

Il test valuta due ipotesi: ipotesi nulla H_0 e ipotesi alternativa H_a .

L'ipotesi nulla afferma che le proporzioni sono uguali, l'ipotesi alternativa invece presume che almeno una delle proporzioni sia diversa. Se il *p-value* risultante dalla statistica dei campioni è inferiore al livello di significatività α (0,05) c'è un'alta probabilità che l'ipotesi alternativa sia vera.

Il confronto tra popolazioni riguarda il grado di contaminazione dei campioni.

Le domande che la tesi ha cercato di chiarire sono le seguenti:

- La testa, la spalla e la coscia hanno un differente grado di contaminazione?
- I lotti campionati sono ugualmente contaminati?
- C'è una diversa contaminazione nei maiali che passavano più tempo in stalla di sosta?
- C'è una diversa contaminazione tra maiali allevati con ciclo aperto rispetto al ciclo chiuso?
- C'è una diversa contaminazione tra maiali trasportati per una distanza maggiore?
- Le zone campionate presentano la stessa contaminazione a vari tempi di attesa in stalla di sosta e ai due tipi di ciclo?

Per quanto riguarda la distanza dal macello, si sono suddivisi i lotti in: minori o uguali a 20 km, tra 20-100 km e superiori a 100 km.

Il tempo di attesa in stalla di sosta è stato categorizzato in: inferiore a un'ora (<1 h) tra due e le dieci ore (2-10 h) e superiori a dieci ore (>10 h).

Il ciclo di allevamento per ovvi motivi è stato suddiviso in aperto e chiuso (*open* o *close*).

3.3 Risultati

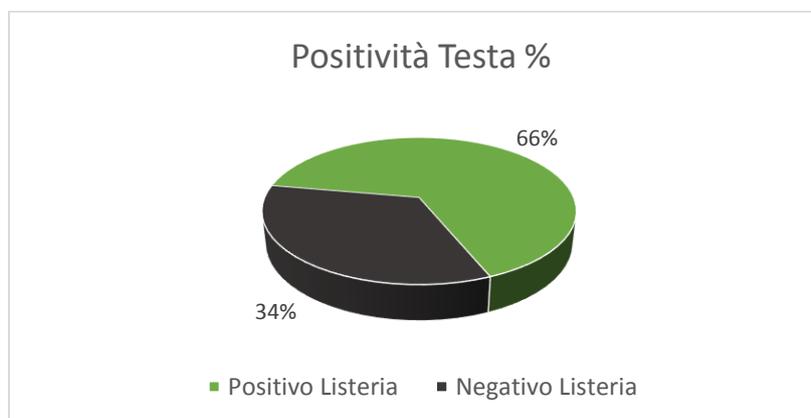
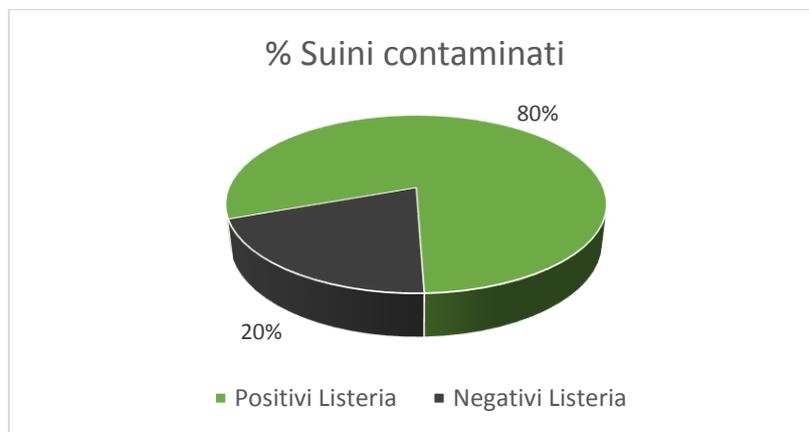
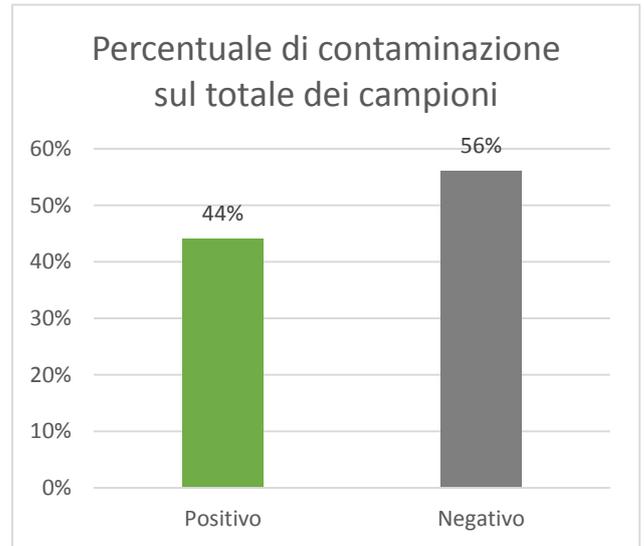
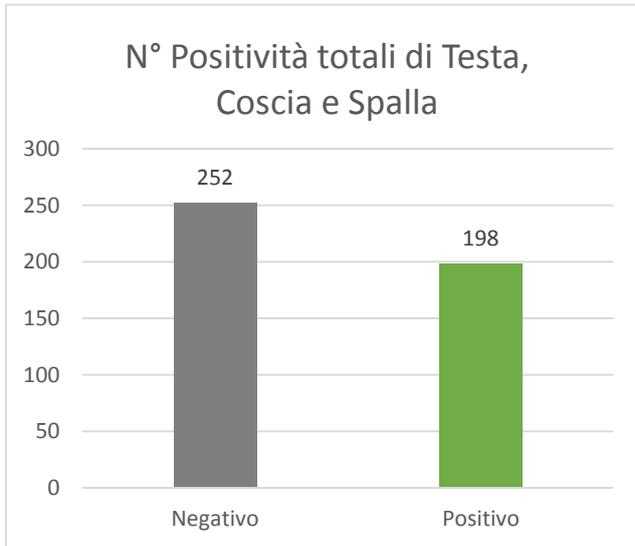
3.3.1 ANALISI QUALITATIVA DI *LISTERIA SPP.*

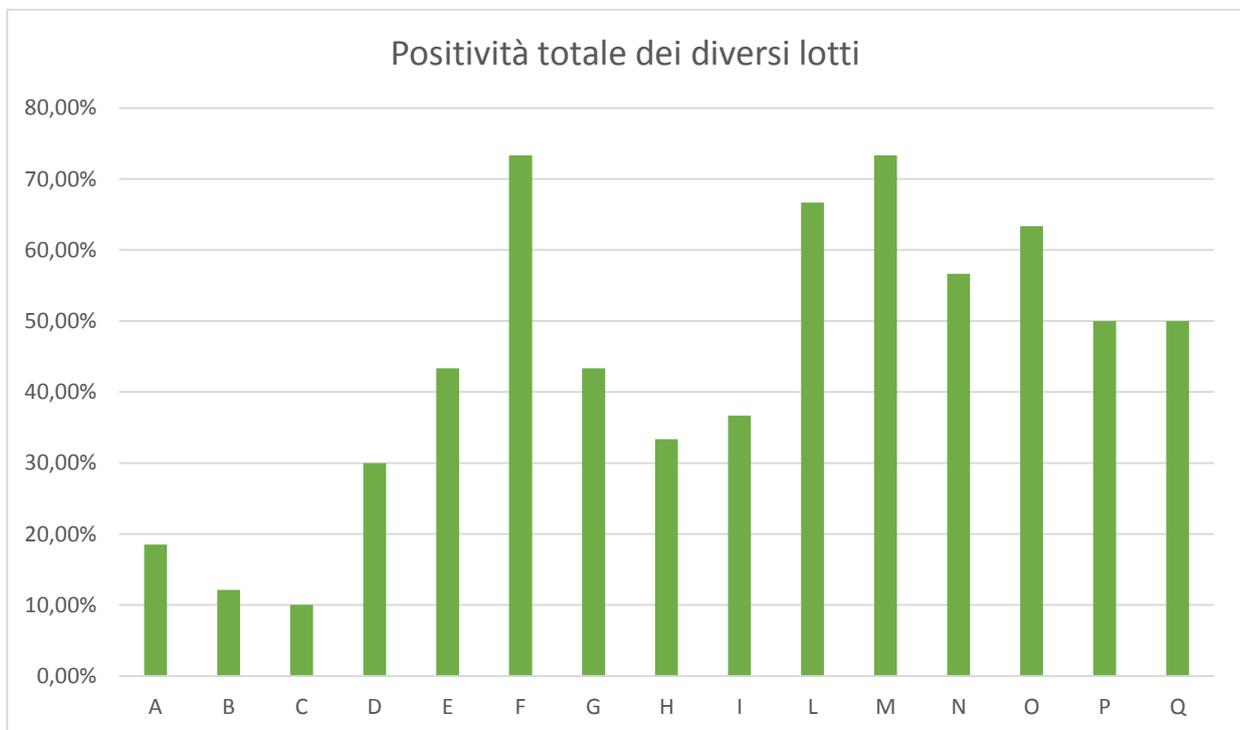
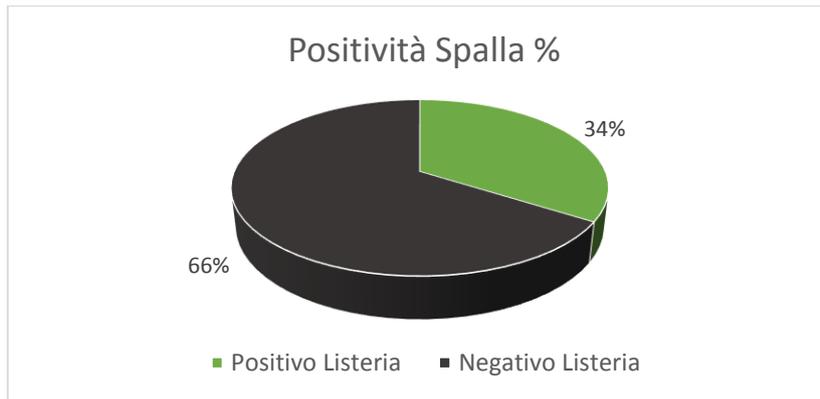
I dati sono riportati in Tabella 6. Dai dati tabellari sono stati elaborati dei grafici che possono essere significativi dell'andamento ottenuto da queste analisi.

Tabella 6

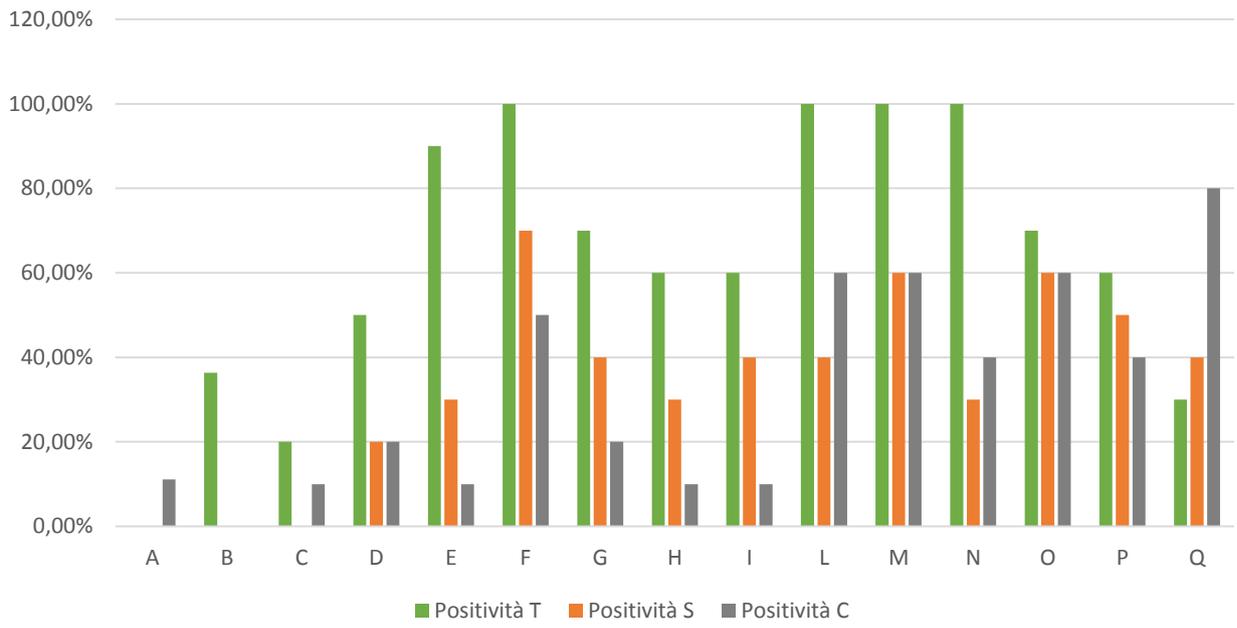
LOTTO	DISTANZA	CICLO ALLEVAMENTO	ATTESA STALLA SOSTA	POSITIVITA'	POSITIVITA'	POSITIVITA'	POSITIVITA'
				TOTALE	TESTA	SPALLA	COSCIA
A	20-100 Km	Aperto	< 1 h	18,52%	44,44%	0,00%	11,11%
B	>100 Km	Aperto	< 1 h	12,12%	36,36%	0,00%	0,00%
C	>100 Km	Aperto	2-10 h	10,00%	20,00%	0,00%	10,00%
D	20-100 Km	Aperto	2-10 h	30,00%	50,00%	20,00%	20,00%
E	20-100 Km	Aperto	< 1 h	43,33%	90,00%	30,00%	10,00%
F	20-100 Km	Aperto	2-10 h	73,33%	100,00%	70,00%	50,00%
G	>100 Km	Aperto	< 1 h	43,33%	70,00%	40,00%	20,00%
H	< 20 Km	Aperto	2-10 h	33,33%	60,00%	30,00%	10,00%
I	< 20 Km	Chiuso	< 1 h	36,67%	60,00%	40,00%	10,00%
L	>100 Km	Aperto	2-10 h	66,67%	100,00%	40,00%	60,00%
M	20-100 Km	Aperto	2-10 h	73,33%	100,00%	60,00%	60,00%
N	< 20 Km	Aperto	< 1 h	56,67%	100,00%	30,00%	40,00%
O	196 km	Chiuso	>10 h	63,33%	70,00%	60,00%	60,00%
P	>100 Km	Chiuso	>10 h	50,00%	60,00%	50,00%	40,00%
Q	< 20 Km	Chiuso	< 1 h	50,00%	30,00%	40,00%	80,00%

3.3.2 GRAFICI





Positività % di Testa, Spalla e Coscia dei diversi lotti

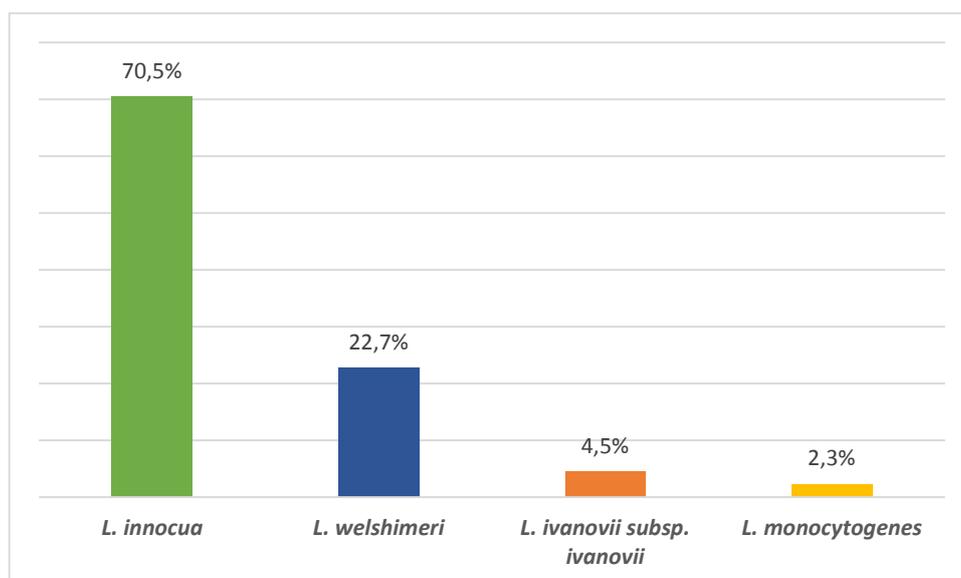


3.3.3 ANALISI BIOLOG MICROBIAL ID SYSTEM

Per le analisi Biolog sono stati scelti, per motivi di costi e di tempi analitici, 44 campioni rappresentanti altrettanti carcasse. I risultati sono i seguenti:

Tabella 7: Percentuale di positività a diverse specie di *Listeria* tramite analisi Biolog

<i>L. innocua</i>	70,5%
<i>L. welshimeri</i>	22,7%
<i>L. ivanovii subsp. ivanovii</i>	4,5%
<i>L. monocytogenes</i>	2,3%



3.3.4 RISULTATI ANALISI STATISTICHE

Tabella 8: Confronto di k proporzioni localizzazione

Zona tampone	Proporzione	Gruppi	
T	0,660	a	
S	0,340		b
C	0,320		b

p-value < 0,0001

Tabella 9: Confronto di k proporzioni lotto

Lotto	Proporzione	Gruppi		
F	0,733	a		
M	0,733	a		
L	0,667	a	b	
O	0,633	a	b	
N	0,567	a	b	c
P	0,500	a	b	c
Q	0,500	a	b	c
E	0,433	a	b	c
G	0,433	a	b	c
I	0,367	a	b	c
H	0,333	a	b	c
D	0,300	a	b	c
A	0,185		b	c
B	0,121			c
C	0,100			c

p-value < 0,0001

Tabella 10: Confronto di k proporzioni distanza dal macello

Distanza dal macello	Proporzione	Gruppi
20-100 km	0,483	a
≤ 20 km	0,442	a
> 100 km	0,404	a

p-value=0,359

Tabella 11: Confronto di k proporzioni tempo di attesa in stalla di sosta

Tempo di attesa in stalla di sosta	Proporzione	Gruppi	
>10 h	0,567	a	
2 - 10 h	0,478	a	b
≤ 1 h	0,371		b

p-value=0,011

Tabella 12: Confronto di k proporzioni tipo di ciclo e zona tampone.

Campione	Proporzione	Gruppi	
Open-T	0,700	a	
Close-T	0,550	a	b
Close-C	0,475	a	b
Close-S	0,475	a	b
Open-S	0,291		b
Open-C	0,264		b

p-value < 0,0001

Tabella 13: Confronto di k proporzioni stalla di sosta e zona tampone

Campione	Proporzione	Gruppi		
2 - 10 h-T	0,717	a		
>10 h-T	0,650	a	b	
≤ 1 h-T	0,614	a	b	
>10 h-S	0,550	a	b	c
>10 h-C	0,500	a	b	c
2 - 10 h-S	0,367		b	c
2 - 10 h-C	0,350		b	c
≤ 1 h-S	0,257			c
≤ 1 h-C	0,243			c

p-value < 0,0001

3.4 Commenti ai risultati

Dalle prove qualitative svolte in laboratorio è emerso che quasi la metà dei campioni analizzati sono contaminati (44%).

L'80% dei suini presentano una contaminazione sulla cute cioè 120 animali su 150. La distribuzione di *Listeria* spp. sulla cute è la seguente: le teste risultano statisticamente più contaminate (66%) rispetto alle spalle (34%) e alle cosce (32%). Questi dati dimostrano come tale contaminazione, più frequentemente associata a *Listeria innocua*, sia molto elevata nei campioni in esame e quindi come sia importante la corretta manipolazione delle carcasse in macello al fine di evitare contaminazioni crociate. L'altro dato molto importante è la diversa localizzazione delle parti anatomiche investigate, con una spiccata positività per la testa (66%). Questa maggiore contaminazione si può spiegare in diversi modi:

- Il suino utilizza il grugno per grufolare e per interagire con gli altri animali dell'allevamento e in tal modo può sporcarsi maggiormente;
- La lingua e le tonsille sono delle zone in cui *Listeria* spp. moltiplica attivamente e in cui si ritrova in prevalenze elevate;
- Durante la macellazione la carcassa viene appesa a testa in giù quindi il sanguinamento e lo sporco delle altre zone per gravità si accumulano in questa zona;
- La testa è la parte della carcassa con la superficie più irregolare perciò è verosimile che nelle normali operazioni di macellazione non si riesca a pulirla adeguatamente.

La maggioranza dei campioni è costituita da *Listeria innocua* (70,5%) seguita da *Listeria welshimeri* (22,7%), *Listeria ivanovii subsp. ivanovii* (4,5%) e *Listeria monocytogenes* (2,3%).

I lotti campionati risultano omogeneamente contaminati e non si sono osservate differenze significative durante il periodo di campionamento. I lotti maggiormente contaminati sono risultati il lotto F e il lotto M, i meno contaminati invece il lotto B e il lotto C.

Il tempo in stalla di sosta è correlato con la contaminazione finale della carcassa; infatti tempi di attesa superiori alle 10 ore rappresentano un aumento di rischio di contaminazione rispetto a tempi di attesa inferiori a un'ora.

La distanza dell'allevamento dal macello e il tipo di ciclo (*open* o *close*) non influiscono sulla contaminazione; una spiegazione al primo dei fattori sopracitati può ricercarsi nel fatto che i maiali

durante il trasporto abbiano poche opportunità di contatto e di movimento all'interno del camion per il trasporto. Il tipo di ciclo non influisce forse perché i suini hanno delle densità standard non influenzate dalla tipologia di flusso in azienda.

Confrontando statisticamente gli effetti della zona anatomica campionata (testa, spalla e coscia) con il tempo medio di permanenza in stalla di sosta, è emerso che gli animali che passano più tempo in stalla di sosta sono più contaminati però l'effetto "testa" è più importante perché animali che passano poco tempo prima della macellazione hanno comunque le teste più contaminate. Un risultato simile si è ottenuto accoppiando il fattore ciclo di allevamento con zona campionata.

Capitolo 4

Considerazioni e conclusioni

Dai risultati ottenuti nel corso di queste prove volte a valutare la diversa contaminazione di *Listeria* spp. in punti distinti delle carcasse è emerso che la maggioranza dei campioni sono contaminati e che la distribuzione topografica è diversa a seconda della sede anatomica. La testa rappresenta la sede più contaminata seguita da spalla e coscia in modo simile. È altresì vero che la maggioranza dei campioni positivi sono rappresentati da *L. innocua*, considerata non patogena, che rappresenta comunque un indicatore della presenza di *L. monocytogenes* e più in generale un indicatore dello stato igienico della carcassa e delle operazioni di macellazione.

La prevenzione, alla luce dei risultati di questo lavoro, si deve attuare in macello.

La stalla di sosta rappresenta il primo momento in cui i maiali possono interagire maggiormente e più aumenta il tempo di attesa più aumentano le probabilità di contaminazione dei suini. Dall'altra parte, però i maiali devono acclimatarsi al nuovo ambiente dopo il trasporto sul camion affinché non siano stressati al momento della macellazione. Lo stress infatti abbassa la qualità della carne con difetti talvolta irreparabili. Per tale motivo sarebbe opportuno limitare per quanto possibile il tempo trascorso dagli animali prima della macellazione senza però eliminare completamente l'acclimatamento.

Durante la macellazione è opportuno eseguire ogni fase nel modo più igienico possibile lavando spesso gli strumenti di lavoro ed evitando il più possibile la contaminazione crociata. La testa è la parte più contaminata. e deve essere staccata dalla carcassa in modo rapido ed efficace da un operatore formato. Questa affermazione vale soprattutto nei salumifici artigianali poiché la mezzena comprensiva della testa è spesso fornita da un macello esterno. È altamente consigliabile separare la testa prima di far entrare le mezzene in lavorazione per non creare contaminazioni crociate.

Questi risultati dimostrano che esiste una specifica localizzazione spaziale di *Listeria* spp. sulla superficie della carcassa dei suini macellati.

La prevenzione si può, quindi, effettuare nel controllo di questo microrganismo e in generale nei confronti di tutta una serie di batteri patogeni che possono rappresentare un rischio per la salute pubblica.

Future ricerche potrebbero focalizzarsi sui seguenti aspetti:

- L' esistenza di localizzazioni spazio-temporali sulle carcasse e quindi verificare se la distribuzione dei batteri sulla carcassa è simile alla distribuzione sulle stesse zone tamponate dell'animale in vita;
- Un' analisi quantitativa di *Listeria* spp. sulle diverse parti anatomiche;
- Stabilire se questi microrganismi derivano dal macello oppure dall'allevamento;
- Stabilire se la distribuzione di altri microrganismi patogeni è simile a quella riscontrata nel corso di questa ricerca.

Capitolo 5

Riferimenti bibliografici

1. Adesiyun, A. A. And Krishnan, C. (1995) 'Occurrence of *Yersinia enterocolitica* O:3, *Listeria monocytogenes* O:4 and thermophilic *Campylobacter* spp. In slaughter pigs and carcasses in Trinidad', *Food Microbiology*, 12(C), pp. 99–107.
2. Angelidis, A. S., Kalamaki, M. S. And Georgiadou, S. S. (2015) 'Identification of non-*Listeria* spp. Bacterial isolates yielding a β -d-glucosidase-positive phenotype on Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA)', *International Journal of Food Microbiology*, 193, pp. 114–129.
3. Aubry, C., Goulard, C., Nahori, M. A., Cayet, N., Decalf, J., Sachse, M., Boneca, I. G., Cossart, P. And Dussurget, O. (2011) 'oata, a peptidoglycan O-acetyltransferase involved in *Listeria monocytogenes* immune escape, is critical for virulence', *Journal of Infectious Diseases*, 204(5), pp. 731–740.
4. Autio, T., Säteri, T., Fredriksson-Ahomaa, M., Rahkio, M., Lundén, J. And Korkeala, H. (2000) 'Listeria monocytogenes contamination pattern in pig slaughterhouses.' *Journal of Food Protection*, 63(10), pp. 1438–42.
5. Barre, L., Angelidis, A. S., Boussaid, D., Brasseur, E. D., Manso, E. And Gnanou Besse, N. (2016) 'Applicability of the EN ISO 11290-1 standard method for *Listeria monocytogenes* detection in presence of new *Listeria* species', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 238, pp. 281–287.
6. Bonardi, S., Brindani, F., Pizzin, G., Lucidi, L., D'Incau, M., Liebana, E. And Morabito, S. (2003) 'Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy', *International Journal of Food Microbiology*, 85(1), pp. 101–110.
7. Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Fernandes Junior, A., Araujo Junior, J. P., Tsunemi, M. H. And Rall, V. L. M. (2014) 'Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures', *Food Control*. Elsevier Ltd, 35(1), pp. 386–391.
8. Borch, E., Nesbakken, T. And Christensen, H. (1996) 'Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria.' *International journal of food microbiology*, 30(1–2), pp. 9–25.

9. Boscher, E., Houard, E. and Denis, M. (2012) 'Prevalence and Distribution of *Listeria monocytogenes* Serotypes and Pulsotypes in Sows and Fattening Pigs in Farrow-to-Finish Farms (France, 2008)', *Journal of Food Protection*, 75(5), pp. 889–895.
10. Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C. And Whiting, R. C. (2017) 'A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments', *Food Control*. Elsevier Ltd, 75, pp. 1–13.
11. Bunčić, S. (1991) 'The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia', *International Journal of Food Microbiology*, 12(2), pp. 173–180.
12. Busser, E. V. De, Maes, D., Houf, K., Dewulf, J., Imberechts, H., Bertrand, S. And Zutter, L. De (2011) 'Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses', *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), pp. 279–286.
13. Chasseignaux, E., Toquin, M. T., Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P. And Ermel, G. (2001) 'Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork-processing plants', *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), pp. 888–899.
14. Chen, J. And Nightingale, K. (2013) *Pathogen update: Listeria monocytogenes*, *Advances in Microbial Food Safety*. Woodhead Publishing Limited.
15. Colby, L. J. And Punda, I. (2009) 'Agribusiness handbook: Red Meat', pp. 1–55.
16. Conficoni, D., Losasso, C., Cortini, E., Di Cesare, A., Giaccone, V., Corno, G. And Ricci, A. (2016) 'Resistance to biocides in *Listeria monocytogenes* collected in meat-processing environments', *Frontiers in Microbiology*, 7.
17. Cossart, P. And Toledo-Arana, A. (2008) '*Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview', *Microbes and Infection*. Elsevier Masson SAS, 10(9), pp. 1041–1050.
18. Den Bakker, H. C., Warchocki, S., Wright, E. M., Allred, A. F., Ahlstrom, C., Manuel, C. S., Stasiewicz, M. J., Burrell, A., Roof, S., Strawn, L. K., Fortes, E., Nightingale, K. K., Kephart, D. And Wiedmann, M. (2014) '*Listeria floridensis* sp. Nov., *Listeria aquatica* sp. Nov., *Listeria cornellensis* sp. Nov., *Listeria riparia* sp. Nov. And *Listeria grandensis* sp. Nov., from agricultural and natural environments', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 6), pp. 1882–1889.
19. Dirksen, G., Gruender, H. D. And Stoeber, M. (2004) 'Medicina Interna e Chirurgia del Bovino.', *Le Point veterinaire Italie*, pp. 1239–1244.

20. Doijad, S. P., Barbuddhe, S. B., Garg, S., Poharkar, K. V., Kalorey, D. R., Kurkure, N. V., Rawool, D. B. And Chakraborty, T. (2015) 'Biofilm-forming abilities of listeria monocytogenes serotypes isolated from different sources', plos ONE, 10(9), pp. 1–14.
21. Donovan, S. (2015) 'Listeriosis: A Rare but Deadly Disease', Clinical Microbiology Newsletter. Elsevier Inc., 37(17), pp. 135–140.
22. Dortet, L., Mostowy, S. And Cossart, P. (2012) 'Listeria and autophagy escape Involvement of InlK, an internalin-like protein', Autophagy, 8(1), pp. 132–134.
23. Duffy, E. A., Belk, K. E., Sofos, J. N., Bellinger, G. R., Pape, A. And Smith, G. C. (2001) 'Extent of microbial contamination in United States pork retail products.', Journal of food protection, 64(2), pp. 172–178.
24. Duggan, S. J., Mannion, C., Prendergast, D. M., Leonard, N., Fanning, S., Gonzales-Barron, U., Egan, J., Butler, F. and Duffy, G. (2010) 'Tracking the Salmonella Status of Pigs and Pork from Lairage through the Slaughter Process in the Republic of Ireland', Journal of Food Protection, 73(12), pp. 2148–2160.
25. Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., Buchrieser, C., Glaser, P. And Cossart, P. (2002) 'Listeria monocytogenes bile salt hydrolase is a prfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis', Molecular Microbiology, 45(4), pp. 1095–1106.
26. EFSA, E. (2016) 'The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015', EFSA Journal, 13.
27. Eurostat (2016) 'Population structure and ageing'.
28. Eurosurveillance editorial team (2015) 'The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013', EFSA Journal, 18(15), p. 20449.
29. Farber, J. M., Daley, E., Coates, F., Beausoleil, N. And Fournier, J. (1991) 'Feeding trials of Listeria monocytogenes with a nonhuman primate model.', Journal of Clinical Microbiology. Am Soc Microbiol, 29(11), pp. 2606–2608.
30. Fenlon D.R., W. J. And Donachie, W. (1996) 'The incidence and level of Listeria monocytogenes contamination of food souces at primary production and initial processing', Journal of Applied Bacteriology, 81, pp. 641–650.
31. Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P. And 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), pp. 150–70.

32. Fleming, David W.; L.Cochi, Stephen; macdonald, Kristine L.;Brondum, Jack; Hayes, Peggy S.; Plikaytis, Brian D.; Holmes, Marion B.; Audurier, A.; Broome, Claire V.; Reingold, A. (1985) 'Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis', *The new England journal of medicine*, 312.
33. Fosse, J., Seegers, H. And Magras, C. (2009) 'Prevalence and Risk Factors for Bacterial Food-Borne Zoonotic Hazards in Slaughter Pigs: A Review', *Zoonoses and Public Health*, 56(8), pp. 429–454.
34. Gaul, L. K., Farag, N. H., Shim, T., Kingsley, M. A., Silk, B. J. And Hyytia-Trees, E. (2013) 'Hospital-acquired listeriosis outbreak caused by contaminated diced celery-texas, 2010', *Clinical Infectious Diseases*, 56(1), pp. 20–26.
35. Giaccone, V., Catellani, P. (2016) 'Diseases of Dairy Animals : Infectious Diseases : Listeriosis', *Reference Module in Food Sciences*, pp. 1–11.
36. Guilbaud, M., Piveteau, P., Desvaux, M., Brisse, S. And Briandet, R. (2015) 'Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning microscopy and the predominance of the honeycomb-like morphotype', *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), pp. 1813–1819.
37. Hellström, S., Laukkanen, R., Siekkinen, K.-M., Ranta, J., Maijala, R. and Korkeala, H. (2010) 'Listeria monocytogenes Contamination in Pork Can Originate from Farms', *Journal of Food Protection. International Association for Food Protection*, 73(4), pp. 641–648.
38. Hill, C., Cotter, P. D., Sleator, R. D. And Gahan, C. G. M. (2002) 'Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: Jumping the hurdles imposed by minimal processing', *International Dairy Journal*, 12(2–3), pp. 273–283.
39. Hurd, H. S., Gailey, J. K. and Griffith, R. W. (2005) 'Variable Abattoir Conditions Affect *Salmonella enterica* Prevalence and Meat Quality in Swine and Pork', *Foodborne Pathogens and Disease*, 2(1), pp. 77–81.
40. Hurd, H. S., Mckean, J. D., Griffith, R. W., Wesley, I. V. And Rostagno, M. H. (2002) '*Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding', *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), pp. 2376–2381.
41. Ibrahim, A. And Rae, I. C. Mac (1991) 'Incidence of *Aeromonas* and *Listeria* spp. In red meat and milk samples in Brisbane, Australia', *International Journal of Food Microbiology*, 12(2), pp. 263–269.
42. Ibusquiza, P. S., Herrera, J. J. R. And Cabo, M. L. (2011) 'Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*', *Food Microbiology. Elsevier Ltd*, 28(3), pp. 418–425.

43. Iida, T., Kanzaki, M., Nakama, A., Kokubo, Y., Maruyama, T. And Kaneuchi, C. (1998) 'Detection of *Listeria monocytogenes* in humans, animals and foods.', *The Journal of veterinary medical science*, 60(12), pp. 1341–1343.
44. ILSI and Walls, I. (2005) Achieving Continuous Improvement in Reductions in Foodborne Listeriosis—A Risk-Based Approach, *Journal of Food Protection*®.
45. Jamali, H. And Radmehr, B. (2014) 'Frequency , virulence genes and antimicrobial resistance of *Listeria spp* . Isolated from bovine clinical mastitis', *The Veterinary Journal*. Elsevier Ltd, 198(2), pp. 541–542.
46. Johnson, J., Jinneman, K., Stelma, G., Smith, B. G., Lye, D., Ulaszek, J., Evsen, L., Gendel, S., Bennett, R. W., Pruckler, J., Steigerwalt, a, Kathariou, S., Volokhov, D., Rasooly, a, Chizhikov, V., Fortes, E., Duvall, R. E., Hitchins, a D., Messer, J., Swaminathan, B., Yildirim, S. And Wiedmann, M. (2004) 'Natural Atypical *Listeria innocua* Strains with *Listeria monocytogenes* Pathogenicity Island 1 Genes', *Applied and environmental microbiology*, 70(7), pp. 4256–66.
47. Kadam, S. R., den Besten, H. M. W., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R. And Abee, T. (2013) 'Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 165(3), pp. 259–264.
48. Kanuganti, S. R., Wesley, I. V, Reddy, P. G., Mckean, J. And Hurd, H. S. (2002) 'Detection of *Listeria monocytogenes* in pigs and pork.', *Journal of food protection*, 65(9), pp. 1470–4.
49. Käsbohrer, A., Protz, D., Helmuth, R., Nöckler, K., Blaha, T., Conraths, F. J. And Geue, L. (2000) 'Salmonella in slaughter pigs of German origin: An epidemiological study', *European Journal of Epidemiology*, 16(2), pp. 141–146.
50. Kastner, R., Dussurget, O., Archambaud, C., Kernbauer, E., Soulat, D., Cossart, P. And Decker, T. (2011) 'lipa, a tyrosine and lipid phosphatase involved in the virulence of *Listeria monocytogenes*', *Infection and Immunity*, 79(6), pp. 2489–2498.
51. Kim, H. B. And Isaacson, R. E. (2015) 'The pig gut microbial diversity: Understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing', *Veterinary Microbiology*. Elsevier B.V., 177(3–4), pp. 242–251.
52. Kocot, A. M. And Olszewska, M. A. (2017) 'Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context', *LWT - Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, 84, pp. 47–57.
53. Korsak, N., Jacob, B., Groven, B., Etienne, G., China, B., Ghafir, Y. And Daube, G. (2003) 'Salmonella Contamination of Pigs and Pork in an Integrated Pig Production System', *Journal of Food Protection*, 66(7), pp. 1126–1133.

54. Lebreton, A., Lakisic, G., Job, V., Fritsch, L., Tham, T. N., Camejo, A., Matteï, P., Regnault, B., Nahori, M., Cabanes, D., Gautreau, A., Ait-si-ali, S., Dessen, A., Cossart, P. And Bierne, H. (2011) 'A Bacterial Protein Targets the BAHD1 Type III Interferon Response', *Science*, 331(March), pp. 1319–1321.
55. Leclercq, A., Moura, A., Tessaud Rita, N., Bracq Dieye, H., Thouvenot, P., Vales, G., Maury, M., Aguilhon, C., Lecuit, M., 2016. *Listeria thailandensis* sp. Nov. Isolated From food in Thailand. *Problems of Listeriosis, Isopol XIX*, 14–17 June 2016, Paris, France
56. Lecuit, M. (2007) 'Human listeriosis and animal models', *Microbes and Infection*, 9(10), pp. 1216–1225.
57. Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaiken, M., Gumbiner, B. And Cossart, P. (1999) 'A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*.' , *The EMBO journal*, 18(14), pp. 3956–3963.
58. Lindblad, M., Lindmark, H., Lambertz, S. T. And Lindqvist, R. (2007) 'Microbiological baseline study of swine carcasses at Swedish slaughterhouses.' , *Journal of food protection*, 70(8), pp. 1790–1797.
59. Mataragas, M., Skandamis, P. N. And Drosinos, E. H. (2008) 'Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations', *International Journal of Food Microbiology*, 126(1), pp. 1–12.
60. Mccollum, J. T., Cronquist, A. B., Silk, B. J., Jackson, K. A., O'Connor, K. A., Cosgrove, S., Gossack, J. P., Parachini, S. S., Jain, N. S., Ettestad, P., Ibraheem, M., Cantu, V., Joshi, M., Duvernoy, T., Fogg, N. W., Gorny, J. R., Mogen, K. M., Spires, C., Teitell, P., Joseph, L. A., Tarr, C. L., Imanishi, M., Neil, K. P., Tauxe, R. V and Mahon, B. E. (2013) 'Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe.' , *The New England journal of medicine*, 369(10), pp. 944–53.
61. Mcintyre, M. K., Peacock, T. J., Akers, K. S. And Burmeister, D. M. (2016) 'Initial characterization of the pig skin bacteriome and its effect on in vitro models of wound healing', *plos ONE*, 11(11), pp. 1–18.
62. Mclauchlin, J. (1997) 'The identification of *Listeria* species', *International Journal of Food Microbiology*, 38(1), pp. 77–81.
63. Mcneill, S. And Van Elswyk, M. E. (2012) 'Red meat in global nutrition', *Meat Science. Elsevier Ltd*, 92(3), pp. 166–173.

64. Meloni, D., Piras, F., Mureddu, A., Fois, F., Consolati, S. G., Lamon, S. And Mazzette, R. (2013) 'Listeria monocytogenes in Five Sardinian Swine Slaughterhouses: Prevalence, Serotype, and Genotype Characterization', *Journal of Food Protection. International Association for Food Protection*, 76(11), pp. 1863–1867.
65. Møller Nielsen, E., Engberg, J. And Madsen, M. (1997) 'Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. Coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine', *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 19(1), pp. 47–56.
66. Monroe, D. (2007) 'Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms', *plos Biology*, 5(11), pp. 2458–2461.
67. Moreno, L. Z., Paixao, R., Gobbi, D. D., Raimundo, D. C., Ferreira, T. P., Hofer, E., Matte, M. H. And Moreno, A. M. (2012) 'Characterization of atypical *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets', *Research in Microbiology*, 163(4), pp. 268–271.
68. Mylonakis, E., Hohmann, E. L. And Calderwood, S. B. (1998) 'Central Nervous System Infection with *Listeria monocytogenes*: 33 Years' Experience at a General Hospital and Review of 776 Episodes from the Literature.', *Medicine. LWW*, 77(5), pp. 313–336.
69. Myszka, K. and Czaczyk, K. (2010) 'Quorum sensing mechanism as a factor regulating virulence of Gram-negative bacteria', *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*, 64, p. 582.
70. Nayak, D. N., Savalia, C. V., Kalyani, I. H., Kumar, R. And Kshirsagar, D. P. (2015) 'Isolation, identification, and characterization of *Listeria* spp. From various animal origin foods', *Veterinary World*, 8(6), pp. 695–701.
71. Nesbakken, T., Eckner, K., Høidal, H. K. And Røtterud, O.-J. (2003) 'Occurrence of *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. In slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering, and dressing procedures', *International Journal of Food Microbiology*, 80(3), pp. 231–240.
72. Nesbakken, T., Kapperud, G. And Caugant, D. A. (1996) 'Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry', *International Journal of Food Microbiology*, 31(1–3), pp. 161–171.
73. Norwood, D. E. And Gilmour, A. (2000) 'The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm', *Journal of Applied Microbiology*, 88(3), pp. 512–520.
74. O'Brien, S. B., Lenahan, M., Sweeney, T. And Sheridan, J. J. (2007) 'Assessing the hygiene of pig carcasses using whole-body carcass swabs compared with the four-site method in EC Decision 471.', *Journal of food protection*, 70(2), pp. 432–439.

75. Orsi, R. H. And Wiedmann, M. (2016) 'Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009', *Applied Microbiology and Biotechnology*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), pp. 5273–5287.
76. Pan, Y., Breidt, F. And Kathariou, S. (2006) 'Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment', *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), pp. 7711–7717.
77. Pan, Y., Breidt, F. And Kathariou, S. (2009) 'Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed-culture biofilms', *Applied and Environmental Microbiology*, 75(18), pp. 5846–5852. Pearce, R. A, Wallace, F. M., Call, J. E., Dudley, R. L., Oser, a, Yoder, L., Sheridan, J. J. And Luchansky, J. B. (2003) 'Prevalence of *Campylobacter* within a swine slaughter and processing facility.', *Journal of food protection*, 66(9), pp. 1550–1556.
78. Perrin, M., Bemer, M. And Delamare, C. (2003) 'Fatal Case of *Listeria innocua* Bacteremia', 41(11), pp. 5308–5309.
79. Pizarro-cerda, J. And Ku, A. (2012) 'Entry of *Listeria monocytogenes* in Mammalian', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, pp. 1–18.
80. Potel, J. (1952) '[Further studies on the causative agent of granulomatosis infantiseptica].', *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite naturwissenschaftliche Abt.: Allgemeine, landwirtschaftliche und technische Mikrobiologie. Germany*, 159(1–2), pp. 86–87.
81. Pouillot, R., Klontz, K. C., Chen, Y., Burall, L. S., Macarasin, D., Doyle, M., Bally, K. M., Strain, E., Datta, A. R., Hammack, T. S. And Van Doren, J. M. (2016) 'Infectious dose of *Listeria monocytogenes* in outbreak linked to ice cream, United States, 2015', *Emerging Infectious Diseases*, 22(12), pp. 2113–2119.
82. Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W. and Constable, P. D. (2006) *Veterinary Medicine E-Book: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Elsevier Health Sciences.
83. Rajabian, T., Gavicherla, B., Heisig, M., Müller-altrock, S., Goebel, W., Gray-owen, S. D. And Ireton, K. (2009) 'The bacterial virulence factor *inlc* perturbs apical cell junctions and promotes cell-cell spread of *Listeria*', *Nat Cell Biol.*, 11(10), pp. 1212–1218.
84. Renterghem, B. Van, Huysman, F., Rygole, R. and Verstraete, W. (1991) 'Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem', *Journal of Applied Bacteriology*. Blackwell Publishing Ltd, 71(3), pp. 211–217.

85. Rocha, P. R. D. A., Dalmaso, A., Grattarola, C., Casalone, C., Del Piero, F., Bottero, M. T. And Capucchio, M. T. (2013) 'Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull', *Research in Veterinary Science*, 94(1), pp. 111–114.
86. Rocourt, J., Hof, H., Schrettenbrunner, A., Malinverni, R. and Bille, J. (1986) 'Meningite purulente aiguë à *Listeria seeligeri* chez un adulte immunocompétent', *Schweiz Med Wochenschr*, 116(8), pp. 248–251.
87. Rodrigues Hoffmann, A. (2017) 'The cutaneous ecosystem: the roles of the skin microbiome in health and its association with inflammatory skin conditions in humans and animals', *Veterinary Dermatology*, 28(1), pp. 60-e15.
88. Sabet, C., Lecuit, M., Cabanes, D. And Cossart, P. (2005) 'ihop - LPXTG protein inlj, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence', 73(10), pp. 6912–6922. D
89. Sabet, C., Toledo-Arana, A., Personnic, N., Lecuit, M., Dubrac, S., Poupel, O., Gouin, E., Nahori, M. A., Cossart, P. And Bierne, H. (2008) 'The *Listeria monocytogenes* virulence factor inlj is specifically expressed in vivo and behaves as an adhesin', *Infection and Immunity*, 76(4), pp. 1368–1378.
90. Saide-Albornoz, J. J., Knipe, C. L., Murano, E. A. And Beran, G. W. (1995) 'Contamination of Pork Carcasses during Slaughter, Fabrication, and Chilled Storage', *Journal of Food Protection. International Association for Food Protection*, 58(9), pp. 993–997.
91. Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V, Widdowson, M.-A., Roy, S. L., Jones, J. L. And Griffin, P. M. (2011) 'Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens', *Emerging infectious diseases. Centers for Disease Control and Prevention*, 17(1), p. 7.
92. Schlech III, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H. And Nicholls, E. S. (1983) 'Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food', *New england journal of medicine. Mass Medical Soc*, 308(4), pp. 203–206.
93. Scott, P. R. (2013) 'Clinical diagnosis of ovine listeriosis', *Small Ruminant Research*, 110(2), pp. 138–141.
94. Sheridan, J. J., Duffy, G., mcdowell, D. A. And Blair, I. S. (1994) 'The occurrence and initial numbers of *Listeria* in Irish meat and fish products and the recovery of injured cells from frozen products', *International Journal of Food Microbiology*, 22(2), pp. 105–113.
95. Shi, X. And Zhu, X. (2009) 'Biofilm formation and food safety in food industries', *Trends in Food Science and Technology. Elsevier Ltd*, 20(9), pp. 407–413.

96. Skovgaard, N. And Nørrung, B. (1989) 'The incidence of *Listeria* spp. In faeces of Danish pigs and in minced pork meat', *International Journal of Food Microbiology*, 8(1), pp. 59–63.
97. Smith, B. P. (1996) *Large animal internal medicine*.
98. Steinbach, G., Blaha, T. And Methner, U. (2002) 'Estimating the prevalence of *Salmonella* spp. In swine herds--influence of sensitivity and specificity of *Salmonella* detection', *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 49(9), pp. 438–444.
99. Stern, N. J. (1981) 'Recovery rate of *Campylobacter fetus* ssp. *Jejuni* on eviscerated pork, lamb, and beef carcasses [Human gastroenteritis].', *Journal of Food Science*.
100. Swaminathan, B. And Gerner-Smidt, P. (2007) 'The epidemiology of human listeriosis', *Microbes and Infection*, 9(10), pp. 1236–1243.
101. Thévenot, D., Dernburg, A. And Vernozy-Rozand, C. (2006) 'An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products', *Journal of Applied Microbiology*.
102. Todeschini, G., Friso, S., Lombardi, S. And Casaril, M. (1998) 'Bacteremia in a Patient with Advanced Hodgkin's Disease', 17(1997), pp. 808–811.
103. Van den Elzen, A. M. G. And Sniijders, J. M. A. (1993) 'Critical points in meat production lines regarding the introduction of *Listeria monocytogenes*', *Veterinary Quarterly*. Taylor & Francis, 15(4), pp. 143–145.
104. Van der Veen, S. And Abee, T. (2011) 'Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 144(3), pp. 421–431.
105. Veiga, E., Guttman, J. A., Bonazzi, M., Boucrot, E., Toledo-Arana, A., Lin, A. E., Enninga, J., Pizarro-Cerdá, J., Finlay, B. B., Kirchhausen, T. And Cossart, P. (2007) 'Invasive and Adherent Bacterial Pathogens Co-Opt Host Clathrin for Infection', *Cell Host and Microbe*, 2(5), pp. 340–351.
106. Volokhov, D. V., Duperrier, S., Neverov, A. A., George, J., Buchrieser, C. And Hitchins, A. D. (2007) 'The presence of the internalin gene in natural atypically hemolytic *Listeria innocua* strains suggests descent from *L. Monocytogenes*', *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), pp. 1928–1939.
107. Walker, J. K., Morgan, J. H., McLauchlin, J., Grant, K. A. and Shallcross, J. A. (1994) '*Listeria innocua* isolated from a case of ovine meningoencephalitis', *Veterinary Microbiology*, 42(2), pp. 245–253.

108. Weber, A., Potel, J., Schäfer-Schmidt, R., Prell, A. And Datzmann, C. (1995) '[Studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in fecal samples of domestic and companion animals]', *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin = International journal of hygiene and environmental medicine*, 198(2), p. 117–123.
109. Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M. and den Bakker, H. C. (2015) '*Listeria booriae* sp. Nov. And *Listeria newyorkensis* sp. Nov., from food processing environments in the USA', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(1), pp. 286–292.
110. Wilson, I. G. (1995) '*Occurrence of Listeria species in ready to eat foods*', *Epidemiology and Infection*. Cambridge University Press, 115(3), pp. 519–526.
111. Wong, H., Chao, W. And Lee, S. (1990) '*in Foods Available in Taiwan*', *Microbiology*, 56(10), pp. 3101–3104.
112. Xavier, C., Gonzales-Barron, U., Paula, V., Estevinho, L. And Cadavez, V. (2014) '*Meta-analysis of the incidence of foodborne pathogens in Portuguese meats and their products*', *Food Research International*. Elsevier Ltd, 55, pp. 311–323.
113. Yokoyama, E., Saitoh, T., Maruyama, S. And Katsube, Y. (2005) '*The marked increase of Listeria monocytogenes isolation from contents of swine cecum*', *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 28(4), pp. 259–268.

Capitolo 6

Sitigrafia

<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/listeriosis-annual-epidemiological-report-2016-2014-data>

(Ultima consultazione: 12-10-2017)

<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>

(Ultima consultazione: 09-10-2017)

<http://www.efsa.europa.eu/it/search/site/listeria>

(Ultima consultazione: 04-10-2017)

<http://www.qualityassurancemag.com/article/aib1214-microbiology-biofilms-food-plants/>

(Ultima consultazione: 07-10-2017)

<http://www.bacterio.net/listeria.html#r>

(Ultima consultazione: 11-10-2017)

<http://www.biolog.com/>

(Ultima consultazione: 12-10-2017)

<http://www.about-listeria.com/>

(Ultima consultazione: 10-10-2017)

Ringraziamenti

Molte persone sono coinvolte direttamente o indirettamente nella stesura di questa tesi e in generale nel percorso di studi.

Ringrazio il Chiarissimo Professore Valerio Giaccone per il trascinate entusiasmo e la profonda passione che ha trasmesso a me e a molti altri.

Ringrazio il Dott. Massimo Marchesan per la grande disponibilità e la collaborazione durante i campionamenti in macello.

Ringrazio il Dott. Riccardo Miotti Scapin per l'organizzazione impeccabile e l'assistenza laboratoristica.

Ringrazio il Dott. Daniele Conficoni per i preziosi consigli impartiti durante questo periodo e per le analisi statistiche.

Ringrazio Michela, Patrizio e Jacopo per avermi aiutato nei campionamenti e durante le analisi in laboratorio.

Ringrazio i miei coinquilini e gli amici di Legnaro per i momenti "poetici" vissuti in questi anni.

Ringrazio tutti gli amici di Recoaro che mi fanno sempre sentire a casa.

Ringrazio la mia famiglia per avermi sempre supportato e sopportato.

Ringrazio Tamara per esserci sempre stata: senza di te questo giorno non sarebbe arrivato e ne conosci il motivo.

Infine, ringrazio Manuel Santagiuliana, alias me stesso, per aver tenuto duro fino alla fine di questo lungo percorso.

