

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA  
FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA  
CORSO DI LAUREA A CICLO UNICO IN MEDICINA VETERINARIA

TESI DI LAUREA

# Prove di inoculazione sperimentale di *Listeria Monocytogenes* in prodotti della gastronomia.

Relatore: Prof. VALERIO GIACCONE

Correlatore: Dott. MARCELLO FERIOLI

Laureanda: LAURA SORAVITO

N° matricola: 497679/MV

ANNO ACCADEMICO 2009/2010



<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LISTERIA MONOCYTOGENES &amp; ALIMENTI PRONTI</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 ALIMENTI PRONTI (RTE <i>ready to eat foods</i>)</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2 ASPETTI GIURIDICI</b> .....	<b>6</b>
2.2.1 PACCHETTO IGIENE .....	6
2.2.2 ALCUNE DEFINIZIONI ESTRAPOLATE DAL PACCHETTO IGIENE.....	8
2.2.3 DESTINATARI DEL REGOLAMENTO 2073/2005 .....	10
2.2.4 OBBLIGHI DELL'OPERATORE DEL SETTORE ALIMENTARE.....	11
2.2.5 ALIMENTI PRONTI E REG. 2073/2005 .....	13
<b>2.3 CHALLENGE TEST</b> .....	<b>19</b>
<b>2.4 LISTERIA MONOCYTOGENES E LISTERIOSI</b> .....	<b>22</b>
2.4.1 IL GENERE <i>LISTERIA</i> : CARATTERISTICHE. ....	22
2.4.2 FATTORI DI VIRULENZA .....	25
2.4.3 DIFFUSIONE DI <i>LISTERIA SPP.</i> E <i>L. MONOCYTOGENES</i> NELL'AMBIENTE.....	28
2.4.4 <i>LISTERIA</i> E ALIMENTI .....	30
2.4.5 LA CARICA INFETTANTE .....	33
2.4.6 LA LISTERIOSI .....	36
2.4.6.1 PATOLOGIA .....	36
2.4.6.2 PATOGENESI.....	39
2.4.6.3 EPIDEMIOLOGIA .....	43
2.4.6.4 LE EPIDEMIE RECENTI.....	45
2.4.6.5 POPOLAZIONE A RISCHIO.....	48
2.4.6.6 COMPORTAMENTI A RISCHIO .....	49
2.4.6.7 PREVENZIONE.....	49
2.4.6.8 TERAPIA.....	50
<b>3. PARTE SPERIMENTALE</b> .....	<b>51</b>
<b>3.1 MATERIALI E METODI</b> .....	<b>51</b>
3.1.1 IMPOSTAZIONI DELLE PROVE .....	51
3.1.2 ESECUZIONE DELLE PROVE .....	55
<b>4. RISULTATI</b> .....	<b>69</b>
<b>4.1 TACCHINO IN SALSA VINAIGRETTE</b> .....	<b>69</b>
<b>4.2 INSALATA DI MARE</b> .....	<b>75</b>
<b>5. CONCLUSIONI</b> .....	<b>81</b>
<b>6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b> .....	<b>83</b>



# 1. INTRODUZIONE

Dal 1900 ad oggi il livello di igiene nel settore delle produzioni alimentari e della loro distribuzione è migliorato in misura consistente. Nonostante gli sforzi, però, stiamo assistendo al concretizzarsi di un fenomeno apparentemente paradossale: malgrado l'aumento delle attenzioni riservate all'igiene lungo tutta la filiera produttiva degli alimenti, i dati epidemiologici nei paesi occidentali ci dicono che il numero degli episodi di malattia alimentare è in costante aumento, rispetto ai valori registrati negli anni passati.

Le ragioni di suddetto fenomeno sono da ricercare nel costante aumento della popolazione mondiale, nell'aumento delle produzioni alimentari e degli scambi di derrate alimentari tra i vari paesi del globo, nel miglioramento delle tecniche analitiche, e nelle scoperte fatte in ambito chimico, che ci permettono ormai di individuare con notevole accuratezza quantità anche minime di contaminanti, nell'affacciarsi sulla scena mondiale di nuovi patogeni "emergenti" (*emerging pathogen*), microrganismi che prima non sembravano in grado di provocare malattia nell'uomo, degli *evolving pathogen* ed in ultima analisi nel cambiamento degli stili di vita e le abitudini alimentari della popolazione.

I *challenge test* o *challenge studies* sono prove di laboratorio che hanno assunto in questi ultimi anni un'importanza decisiva ai fini del nuovo controllo dell'igiene delle produzioni alimentari, così come esso emerge dai testi dei Regolamenti comunitari che formano il cosiddetto "pacchetto igiene".

Oggi il controllo della qualità igienico-sanitaria degli alimenti non si fa più esaminando a campione le singole partite di alimenti prodotti, come avveniva sino a non molti anni fa. Per garantire la salubrità dei suoi prodotti l'Operatore del Settore Alimentare (OSA) deve arrivare ad avere il più possibile sotto controllo i suoi processi produttivi.

In altri termini, se il produttore ha la certezza di avere sotto controllo il proprio processo produttivo, si può dare per scontato che tutte le partite di alimenti prodotti in quelle condizioni avranno caratteristiche igieniche e di qualità ineccepibili per quanto riguarda il rispetto delle normative europee vigenti in materia.

È ovvio che un simile assunto è un concetto teorico; nella pratica operativa quotidiana, è opportuno che l'OSA metta in opera dei sistemi di verifica per stabilire se effettivamente i processi produttivi sono sotto controllo. Al momento la metodologia più razionale e obiettiva per avere il controllo dell'igiene nei processi produttivi è quella dell'HACCP;

perciò il legislatore comunitario ha reso obbligatoria l'applicazione di questa metodologia in tutte le aziende alimentari, indistintamente.

Le autorità sanitarie ufficiali di stato, dal canto loro, sono chiamate a verificare con obiettività e correttezza scientifica che gli OSA abbiano effettivamente sotto controllo i loro processi produttivi.

Il Reg. CE n. 178/02, all'art. 14, prevede che non possano essere posti in commercio gli alimenti a rischio, definendo tali quelli dannosi per la salute umana o inadatti al consumo umano. Dallo stesso Reg. n. 178/02 e dagli altri Regolamenti che formano il "pacchetto igiene" desumiamo che sono:

- (1) dannosi per la salute umana gli alimenti che contengono microrganismi, loro tossine, prodotti del loro metabolismo o residui di composti chimici in quantità superiori ai limiti di tollerabilità del nostro organismo,
- (2) inadatte al consumo umano le derrate che presentano caratteristiche sensoriali e/o nutrizionali non conformi allo standard noto di ciascuna di esse e che manifestano segni di alterazione o deterioramento.

Di conseguenza, gli alimenti che possono andare a consumo perché igienicamente sicuri (safe o salubri, secondo il principio della *food safety*) sono quelli che:

- contengono microrganismi o residui di composti chimici potenzialmente pericolosi, ma in quantità ancora tollerabili da un essere umano,
- hanno caratteristiche sensoriali e/o nutrizionali loro tipiche, nelle condizioni di conservazione previste dal produttore.

In quest'ottica, il challenge test assume un ruolo determinante perché viene a costituire una garanzia di innocuità degli alimenti per la salute umana. Di conseguenza, le industrie alimentari sono chiamate sempre più sovente a porlo in atto, specialmente da quando è entrato in vigore il Reg. CE n.2073/05 che ha stabilito alcuni criteri di sicurezza per quei gruppi di alimenti che potenzialmente sono più a rischio di altri di indurre malattia alimentare nell'uomo, tra cui vi sono gli alimenti pronti, quali i prodotti di gastronomia presi in esame, sottoposti a un processo di trasformazione (come la cottura) tale che l'uomo può consumarli senza sottoporli a ulteriori trattamenti debatterizzanti (*Ready-To-Eat food*).

A fronte del rilievo che il *challenge test* ha assunto nell'ottica della qualità igienicosanitaria degli alimenti, va però sottolineato che al momento le idee su cosa sia un vero *challenge test* sono ancora piuttosto confuse, a partire dalla corretta traduzione del termine.

C'è chi parla di “prove di contaminazione sperimentale” e chi, invece, traduce *challenge test* con “prove di inoculazione sperimentale”. Scopo di questa tesi è che si riescano ad avere conoscenze più chiare su come si debba pianificare ed eseguire un vero *challenge test* perché sui risultati di queste prove di inoculazione sperimentale gli OSA dovranno poi impostare i loro controlli aziendali interni.

Per l'OSA è essenziale capire bene che cosa deve essere un vero *challenge test*, perché sbagliandone l'impostazione si rischia di ottenere dati errati sul comportamento del microrganismo o del composto chimico oggetto di *challenge*.





## 2. *LISTERIA MONOCYTOGENES* & ALIMENTI PRONTI

### 2.1 ALIMENTI PRONTI (RTE *ready to eat foods*)



Gli alimenti pronti (RTE *ready to eat*) sono alimenti preparati in modo tale da essere microbiologicamente sicuri, commestibili e pronti all'utilizzo senza una preventiva preparazione aggiuntiva.

Per definizione del *Reg. 2073/05*, gli alimenti pronti sono quei "prodotti alimentari destinati dal produttore o dal fabbricante al consumo

umano diretto, senza che sia necessaria la cottura o altro trattamento per eliminare o ridurre a un livello accettabile i microrganismi presenti".

Essi hanno conquistato in breve tempo ampie fette di mercato grazie alla loro praticità d'utilizzo e rappresentano una delle più importanti innovazioni tecnologiche odierne in campo alimentare. Le nuove tendenze del consumatore alimentare vedono un consumatore sempre più esigente in termini di qualità ma nel contempo sempre più attratto da alimenti funzionali e pratico all'utilizzo quali gli alimenti ready to eat.

Secondo un recente rapporto globale presentato da GIA (Global Industry Analyst), il mercato dei piatti pronti al consumo supererà gli 81 miliardi di dollari entro il 2015. La crescente occupazione femminile, l'aumento del reddito, l'occidentalizzazione delle abitudini alimentari sono alcuni dei fattori trainanti della sempre maggiore richiesta di piatti pronti. Ai tradizionali vantaggi che sottolineano la "convenienza" e la "microondabilità" del prodotto, negli ultimi due anni si sono aggiunti anche quelli che indicano un prodotto "sano" e "naturale/biologico", caratteristiche che fanno sempre più presa sul consumatore. L'Europa domina il mercato dei piatti pronti al consumo: a partire dal 1990, infatti, l'atteggiamento degli europei nei confronti del cibo è cambiato in modo significativo: tra i



fattori chiave che hanno indirizzato il cambiamento, figurano il miglioramento del tenore di vita, la necessità di poter consumare alimenti convenienti in un tempo disponibile sempre più limitato. Oggi circa il 40% degli Europei consuma almeno un pasto fuori casa e di solito si tratta di preparazioni con alimenti già assemblati e pronti a cottura rapida (RTC *Ready-to-Cook food*) o già pronti a consumo, con un blando riscaldamento (RTE *Ready-To-Eat food*). I distributori automatici di simili preparazioni sono ormai piuttosto diffusi e la gamma di piatti che offrono (anche di pesce) aumenta di continuo.

La Regione Asia-Pacifico rappresenta, invece, il mercato in più rapida espansione per quanto riguarda questi prodotti; sebbene in questi Paesi si preferiscano ancora cibi locali cucinati in casa, anche qui l'aumento del reddito, la diffusione di frigoriferi e forni a microonde, la rapida penetrazione di note catene di vendita, e la crescente popolarità di cibi "convenienti" stanno incrementando la domanda di piatti pronti. Va però detto che le restrizioni religiose relative al consumo di carne bovina e suina continuano ad ostacolare l'aumento della domanda di piatti pronti a base di carne, tanto quanto la mancanza di adeguate strutture di stoccaggio per i prodotti surgelati.

## **2.2 ASPETTI GIURIDICI**

### **2.2.1 PACCHETTO IGIENE**

Al *regolamento 178/02* in vigore dal gennaio 2005, (testo che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare), è seguita l'entrata in vigore dal primo gennaio 2006 del "Pacchetto Igiene": un gruppo di regolamenti e direttive che riordinano la normativa comunitaria in materia di igiene e di controlli sugli alimenti e precisando le tematiche della sicurezza alimentare e le modalità di applicazione del sistema HACCP e superando le normative comunitarie in materia di autocontrollo, basate sulla *Direttiva 94/43/CEE*.

Il "Pacchetto Igiene" è composto da:

- Reg. (CE) n° 852/2004, "sull'igiene dei prodotti alimentari".
- Reg. (CE) n° 853/2004, "che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale".
- Reg. (CE) n° 854/2004, "che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano".
- Reg. (CE) n° 882/2004, "relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali".
- Dir.2002/99/CE, "norme di polizia sanitaria per la produzione, la trasformazione, la distribuzione e l'introduzione di prodotti di origine animale destinati al consumo umano".
- Dir.2004/41/CE, "che abroga alcune direttive recanti norme sull'igiene dei prodotti alimentari e le disposizioni sanitarie per la produzione e la commercializzazione di determinati prodotti di origine animale destinati al consumo umano e che modifica le direttive 86/662/CEE del Consiglio e 92/118/CEE e la decisione 95/408/CE del Consiglio".

Nella stessa data, 1° gennaio 2006, entrano altresì in vigore:

- Reg. (CE) 183/2005, "che stabilisce requisiti per l'igiene dei mangimi".
- Reg. (CE) 2074/2005, "recante modalità di attuazione relative a taluni prodotti di cui al regolamento (CE) n° 853/2004 e all'organizzazione di controlli ufficiali a norma dei regolamenti (CE) n° 854/2004 e 852/2004, deroga al regolamento (CE) n° 852/2004 e modifica dei regolamenti (CE) n°853/2004 e 854/2004".
- Reg. (CE) n° 2075/2005, "che definisce norme specifiche applicabili ai controlli ufficiali relativi alla presenza di trichine nelle carni".
- Reg. (CE) n° 2076/2005, "che fissa disposizioni transitorie per l'attuazione dei regolamenti (CE) n° 853/2004, 854/2004 e 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e che modifica i regolamenti (CE) n° 853/2004 e 854/2004".
- Reg. (CE) 2073/2005, "sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari".

## 2.2.2 ALCUNE DEFINIZIONI ESTRAPOLATE DAL PACCHETTO IGIENE

Dal regolamento 2073/2005 (art. 2)

**Microrganismi:** i batteri, i virus, i lieviti, le muffe, le alghe, i protozoi parassiti, gli elminti parassiti microscopici, le loro tossine e i loro metaboliti

**Criterio microbiologico:** un criterio che definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all'assenza, alla presenza o al numero di microrganismi e/o in base alla quantità delle relative tossine/metaboliti, per unità di massa, volume, area o partita

**Criterio di sicurezza alimentare(CSA):** un criterio che definisce l'accettabilità di un prodotto o di una partita di prodotti alimentari, applicabile ai prodotti immessi sul mercato;

### **Criterio di igiene di processo (CIP)**

un criterio che definisce il funzionamento accettabile del processo di produzione.

Questo criterio, che non si applica ai prodotti immessi sul mercato, fissa un valore indicativo di contaminazione al di sopra del quale sono necessarie misure correttive volte a mantenere l'igiene del processo di produzione in ottemperanza alla legislazione in materia di prodotti alimentari

**Partita:** un gruppo o una serie di prodotti identificabili ottenuti mediante un determinato processo in circostanze praticamente identiche e prodotti in un luogo determinato entro un periodo di produzione definito

**Conservabilità:** il periodo che corrisponde al periodo che precede il termine minimo di conservazione o la data di scadenza, come definiti rispettivamente agli articoli 9 e 10 della direttiva 2000/13/CE

**Alimenti pronti:** i prodotti alimentari destinati dal produttore o dal fabbricante al consumo umano diretto, senza che sia necessaria la cottura o altro trattamento per eliminare o ridurre a un livello accettabile i microrganismi presenti

**Alimenti per lattanti:** i prodotti alimentari destinati specificamente ai lattanti, come definiti dalla direttiva 91/321/CEE della Commissione alimenti destinati a fini medici speciali: gli alimenti dietetici destinati a fini medici speciali, come definiti dalla direttiva 1999/21/CE della Commissione (2)

**Campione:** una serie composta di una o più unità o una porzione di materia selezionate tramite modi diversi in una popolazione o in una quantità significativa di materia e destinate a fornire informazioni su una determinata caratteristica della popolazione o della materia oggetto di studio e a costituire la base su cui fondare una decisione relativa alla popolazione o alla materia in questione o al processo che le ha prodotte

**Campione rappresentativo:** un campione nel quale sono mantenute le caratteristiche della partita dalla quale è prelevato, in particolare nel caso di un campionamento casuale semplice, dove ciascun componente o aliquota della partita ha la stessa probabilità di figurare nel campione

**Conformità ai criteri microbiologici:** l'ottenimento di risultati soddisfacenti o accettabili di cui all'allegato I nei controlli volti ad accertare la conformità ai valori fissati per i criteri mediante il prelievo di campioni, l'effettuazione di analisi e l'attuazione di misure correttive.

Dal regolamento 853/2004 si riportano di seguito alcune definizioni relative ai prodotti della gastronomia oggetto di questa tesi.

#### Regolamento 853/2004

##### CARNI

**Carne:** tutte le parti commestibili degli animali di cui ai punti da 1.2 a 1.8, compreso il sangue

**Preparazioni di carni:** carni fresche, incluse le carni ridotte in frammenti, che hanno subito un'aggiunta di prodotti alimentari, condimenti o additivi o trattamenti non sufficienti a modificare la struttura muscolo-fibrosa interna della carne e ad eliminare quindi le caratteristiche delle carni fresche

Pollame: carni di volatili d'allevamento, compresi i volatili che non sono considerati domestici ma che vengono allevati come animali domestici, ad eccezione dei ratiti

##### MOLLUSCHI BIVALVI VIVI

**Molluschi bivalvi:** i molluschi lamellibranchi filtratori

##### PRODOTTI DELLA PESCA

**Prodotti della pesca:** tutti gli animali marini o di acqua dolce (ad eccezione dei molluschi bivalvi vivi, echinodermi vivi, tunicati vivi e gasteropodi marini vivi e di tutti i mammiferi, rettili e rane), selvatici o di allevamento, e tutte le forme, parti e prodotti commestibili di tali animali

**Prodotti della pesca freschi:** i prodotti della pesca non trasformati, interi o preparati, compresi i prodotti imballati sotto vuoto o in atmosfera modificata che, ai fini della conservazione, non hanno subito alcun trattamento diverso dalla refrigerazione, inteso a garantirne la conservazione

**Prodotti della pesca preparati:** i prodotti della pesca non trasformati sottoposti ad una operazione che ne abbia modificato l'integrità anatomica, quali l'eviscerazione, la decapitazione, l'affettatura, la sfilettatura e la tritatura.

### **2.2.3 DESTINATARI DEL REGOLAMENTO 2073/2005**

Il regolamento 2073/2005 si rivolge a tutti gli operatori del settore alimentare (OSA) che operano nelle diverse fasi della filiera quali lavorazione, fabbricazione, manipolazione compreso la fase della vendita al dettaglio e della distribuzione. La sua lettura deve essere fatta tenendo in mente i concetti e l'approccio preventivo "dalla stalla alla forchetta (*from farm to fork*) per la sicurezza degli alimenti relativi ai regolamenti del "pacchetto igiene".

Infatti il regolamento 2073/2005 non prende in considerazione solo i microrganismi, ma assegna un ruolo determinante sia alle procedure di gestione della sicurezza quali HACCP, GHP e GMP applicate ai diversi livelli della filiera, sia agli alimenti in se introducendo per quest'ultimi alcuni fattori legati al tipo di substrato alimentare che condizionano lo sviluppo microbico. Sebbene i nuovi criteri microbiologici siano concepiti per essere utilizzati dagli operatori alimentari nel contesto delle pratiche di gestione della sicurezza, essi si applicano anche ai campioni prelevati per controlli ufficiali per la verifica della conformità degli alimenti allo stesso regolamento 2073/2005.

I produttori primari sono esclusi dall'applicazione delle nuove disposizioni, in quanto il regolamento 2073/2005 non prevede nessun criterio per i prodotti alimentari primari ad eccezione dei semi germogliati, molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi.

Ciononostante, anche se in modo indiretto, i produttori primari entrano in gioco nel momento in cui in qualità di fornitori di materie prime, devono garantire tutta una serie di condizioni o specifiche previste dalle procedure per la sicurezza adottate dai produttori post-primari e formalizzate nei contratti di fornitura.

## 2.2.4 OBBLIGHI DELL'OPERATORE DEL SETTORE ALIMENTARE

Un elemento trasversale ai regolamenti del "pacchetto igiene" è quello relativo alla responsabilità primaria degli operatori alimentari per la sicurezza degli alimenti. Questo concetto introdotto con forza dal regolamento 178/2002 viene a porre al centro della materia "sicurezza alimentare", il complesso delle azioni e procedure adottate dagli operatori alimentari in merito al processo di produzione, tipo di lavorazione impiegato e prodotto alimentare. Gli operatori alimentari in sostanza, così come previsto dall' art. 3 del Reg. 2073/2005 e dal regolamento 852/2004, che costituisce la base legale del regolamento 2073/2005 (tabella 1), devono rispettare i criteri microbiologici (ed adottare le azioni o interventi correttivi in caso di non conformità), assicurando in particolare che:

- 1) le attività di manipolazione, lavorazione e lavorazione delle materie prime e prodotti alimentari siano svolte in modo tale che siano rispettati i criteri di igiene di processo;
- 2) i criteri di sicurezza alimentare che si applicano durante tutto il periodo di conservabilità o *shelf life* dei prodotti siano mantenuti se sono soddisfatti le condizioni previste per la fase di distribuzione e conservazione.

Se necessario inoltre gli operatori del settore alimentare secondo il succitato regolamento devono effettuare studi, in conformità all'allegato II, per verificare se i criteri sono rispettati per l'intera durata del periodo di conservabilità. In particolare ciò si applica agli alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes* e che possono costituire un rischio per la salute pubblica.

Nel allegato II del Reg. CE n. 2073/05 troviamo scritto:

« Gli studi di cui all'articolo 3, paragrafo 2, comprendono:

- prove per determinare le caratteristiche fisico-chimiche del prodotto, quali pH,  $A_w$ , contenuto salino, concentrazione di conservanti e tipo di sistema di confezionamento, tenendo conto delle condizioni di lavorazione e di conservazione, delle possibilità di contaminazione e della conservabilità prevista,
- consultazione della letteratura scientifica disponibile e dei dati di ricerca sulle caratteristiche di sviluppo e di sopravvivenza dei microrganismi in questione».

In prima istanza, quindi, gli estensori del Reg. 2073/05 chiedono all'OSA di conoscere il meglio possibile le caratteristiche chimico-fisiche di composizione e struttura dell'alimento che producono.

Lo stesso Allegato II del Reg. CE n. 2073/05 specifica altresì:

«Se necessario, in base agli studi summenzionati, l'operatore del settore alimentare effettua studi ulteriori, che possono comprendere:

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

Il legislatore comunitario conclude, infine, le sue istruzioni aggiungendo:

«Gli studi summenzionati tengono conto della variabilità intrinseca in funzione del prodotto, dei microrganismi in questione e delle condizioni di lavorazione e conservazione».

Tabella 1. Regolamento 852/2004 (Art. 4)

3. Gli operatori del settore alimentare se necessario adottano le seguenti misure igieniche specifiche:
- a) rispetto dei criteri microbiologici relativi ai prodotti alimentari;
  - b) le procedure necessarie a raggiungere gli obiettivi fissati per il conseguimento degli scopi del presente regolamento;
  - c) rispetto dei requisiti in materia di controllo delle temperature degli alimenti;
  - d) mantenimento della catena del freddo;
  - e) campionature e analisi.
4. I criteri, i requisiti e gli obiettivi di cui al paragrafo 3 sono adottati secondo la procedura di cui all'articolo 14, paragrafo 2. I metodi connessi di campionatura e di analisi sono stabiliti secondo la stessa procedura.
5. Se il presente regolamento, il regolamento (CE) n. 853/2004 \* e le relative misure di applicazione non specificano i metodi di campionatura o di analisi, gli operatori del settore alimentare possono utilizzare metodi appropriati contenuti in altre normative comunitarie o nazionali o, qualora non siano disponibili, metodi che consentano di ottenere risultati equivalenti a quelli ottenuti utilizzando il metodo di riferimento, purché detti metodi siano scientificamente convalidati in conformità di norme o protocolli riconosciuti a livello internazionale.
6. Gli operatori del settore alimentare possono utilizzare i manuali di cui agli articoli 7, 8 e 9 come ausilio ai fini dell'osservanza dei loro obblighi ai sensi del presente regolamento.



## 2.2.5 ALIMENTI PRONTI E REG. 2073/2005

Per definizione del Reg. 2073/05, gli alimenti pronti sono quei "prodotti alimentari destinati (...) al consumo umano diretto, senza che sia necessaria la cottura o altro trattamento per eliminare o ridurre a un livello accettabile i microrganismi presenti".

La gamma degli alimenti pronti che l'uomo può consumare tal quali (RTE Ready-to-Eat) è molto ampia, ma non tutti gli alimenti pronti sono "pronti" ai sensi del Reg.2073/05.

Nella nota (4) al fondo del capitolo 1, gli estensori del regolamento hanno specificato che il criterio di sicurezza *L. monocytogenes* non si applica a una serie di prodotti alimentari che, pur essendo pronti a consumo senza ulteriore cottura, hanno caratteristiche tali per cui si può ragionevolmente escluderne un inquinamento da parte del batterio. Questa considerazione va sottolineata, perché alcuni OSA potrebbero essere portati a travisare e ad applicare le regole del Reg. 2073/05 anche a prodotti cui, invece, esse non si devono applicare.

Gli alimenti pronti a consumo per i quali non si applica quanto previsto dal Reg. CE 2073/05 sono:

- (1) gli alimenti che, dopo il confezionamento, sono stati sottoposti a un trattamento termico tale da inattivare le listerie eventualmente accumulate in precedenza (in pratica, le conserve e quei prodotti che subiscono un secondo trattamento di pastorizzazione in acqua bollente o vapore dopo che sono stati confezionati in pellicola plastica sotto vuoto). L'ermeticità della confezione esclude con buon margine di certezza che l'alimento si possa contaminare dopo il trattamento termico,
- (2) frutta e ortaggi freschi non tagliati e non trasformati, perché è difficile che il batterio riesca a penetrare all'interno dei loro tessuti, a foglia integra,
- (3) pane, biscotti e prodotti analoghi. Si ammette che siano alimenti con un'attività dell'acqua libera (valore di  $A_w$ ) talmente bassa da impedire la proliferazione del batterio,
- (4) acqua, bibite, sidro, vino, bevande spiritose e prodotti analoghi, se sono presentati al consumatore in bottiglia o contenitore chiusi. I trattamenti di pastorizzazione o potabilizzazione cui sono sottoposte alcune bevande e il tenore in alcool di altre sono condizioni che inibiscono efficacemente la crescita di poche *L. monocytogenes* che giungano a inquinare il prodotto,

(5) zucchero, miele e dolci, compresi i prodotti a base di cacao e cioccolato. In questo caso il fattore determinante che ci mette al riparo da un'eventuale proliferazione del batterio è il ridotto valore di  $A_w$  che caratterizza tutti questi prodotti pronti a consumo, (6) i molluschi bivalvi vivi perché *L. monocytogenes* non costituisce un componente della loro tipica flora microbica.

I criteri di sicurezza per *L. monocytogenes* variano in base alla destinazione dell'alimento pronto. Le maggiori attenzioni sono riservate agli alimenti pronti destinati ai lattanti e a fini medici speciali, per i quali il criterio individuato è l'assenza di 1 ufc di *L. monocytogenes* in 25 g di 10 unità campionarie del campione.

Gli alimenti pronti destinati genericamente a tutti i consumatori sono stati ulteriormente suddivisi dagli esperti in due sotto-categorie:

- (1) alimenti che possono costituire substrato favorevole alla crescita di *L. monocytogenes* (che formano oggetto della mia odierna relazione)
- (2) alimenti che per vari motivi non costituiscono terreno favorevole alla crescita del batterio.

Nel primo caso il criterio che l'OSA dovrà rispettare è più restrittivo: tenendo sotto controllo il suo processo produttivo, egli deve assicurare che in ogni lotto di produzione non si potrà isolare nemmeno 1 *L. monocytogenes* in 125 g di alimento quando il prodotto è ancora sotto il suo controllo, prima della distribuzione ai punti di vendita, provvedendo all'analisi di 5 unità campionarie ciascuna di 25 g.

Nel secondo caso si ammette, invece, che nell'alimento si possano tollerare fino a 100 ufc di *L. monocytogenes* per grammo di alimento in 5 unità campionarie fino a fine vita commerciale del prodotto (Tabella. 2)

## TABELLA 2.

Reg 2073/2005, capitolo 1. Criteri di sicurezza alimentare

Categoria alimentare	Microorganismi/loro tossine, metaboliti	Piano di campionamento <sup>(1)</sup>		c	Limiti <sup>(2)</sup>		Metodo d'analisi di riferimento <sup>(3)</sup>	Fase a cui si applica il criterio
		n	m		M			
1.1 Alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali <sup>(4)</sup>	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	Assente in 25 g	0	Assente in 25 g <sup>(7)</sup>	EN/ISO 11290-1	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità	
1.2 Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L. monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	100 ufc/g <sup>(5)</sup>	0	Assente in 25 g <sup>(7)</sup>	EN/ISO 11290-2 <sup>(6)</sup>	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità	
1.3 Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L. monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali <sup>(4)</sup> <sup>(8)</sup>	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	100 ufc/g	0	Assente in 25 g <sup>(7)</sup>	EN/ISO 11290-1	Prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce	

Le condizioni grazie alle quali l'OSA può classificare il suo prodotto nella prima sottocategoria o nella seconda, sono fornite dallo stesso Regolamento 2073/05.

Un alimento pronto a consumo si potrà ragionevolmente classificare come "tale che non costituisce terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*" se:

- (1) ha un valore di pH medio 4,4
- (2) ha un valore di  $A_w$  medio 0,920
- (3) ha, in associazione, un valore di pH 5,0 e un  $A_w$  0,940
- (4) la sua *shelf-life* è inferiore a 5 giorni
- (5) se l'OSA ha una giustificazione scientifica che autorizza questa classificazione.

In tutti gli altri casi, un alimento pronto va classificato come substrato che "consente la crescita di *L. monocytogenes*".(tabella 6)

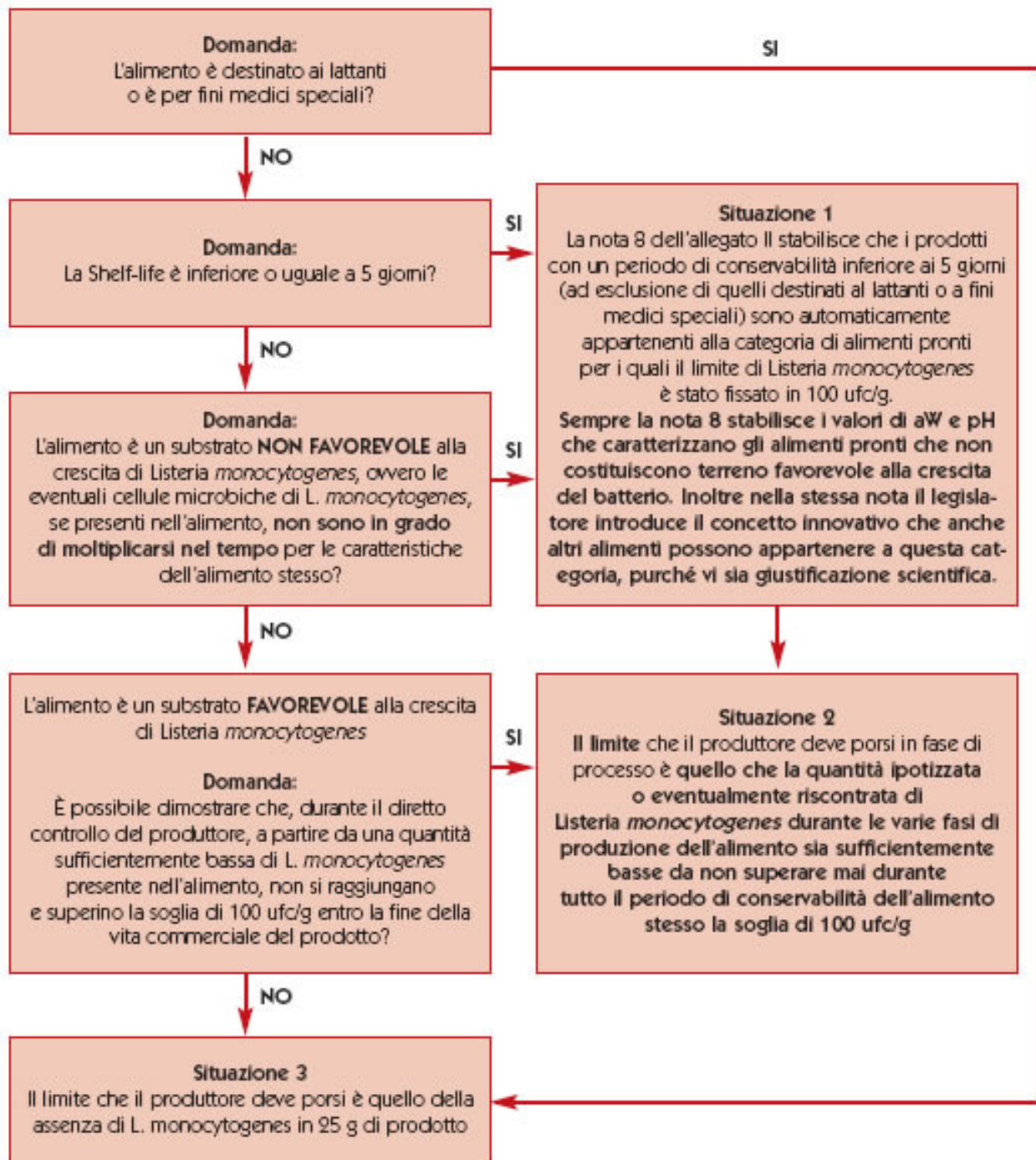
Gli esperti che hanno stilato il Reg. CE 2073/05 hanno tenuto in considerazione vari aspetti di fisiologia e di ecologia microbica di *L. monocytogenes*, riconoscendo che adeterminate condizioni di pH e/o di  $A_w$  del substrato il batterio non è materialmente in grado di duplicare attivamente (vedi tabella 3).

**TABELLA 3.**

Condizioni NON favorevoli allo sviluppo di <i>Listeria Monocytogenes</i>	
$A_w \leq 0,92$ Oppure $pH \leq 4,4$	$A_w \leq 0,94$ e, contemporaneamente, $pH \leq 5$

Schematicamente, le situazioni contemplate dal Regolamento in questione, relativamente ai parametri di *Listeria monocytogenes*, possono essere evidenziate come nella seguente tabella (TABELLA 4).

**TABELLA 4.**



Il produttore alimentare può quindi venirsi a trovare in tre diverse situazioni: nella prima e nella terza, di fatto opposte fra loro, il compito "decisionale" del produttore è più semplice; egli dovrà, a seconda dei due casi, procedere ad effettuare delle verifiche che confermino, nel caso della situazione 1, un livello minore 100 ufc/g di *L. monocytogenes* all'inizio della vita commerciale del prodotto, sapendo che le caratteristiche di questo sono tali, nella peggiore delle ipotesi, da non permettere lo sviluppo del microrganismo, ed in certi casi particolari addirittura da ridurre la concentrazione; nel caso della situazione 3, il criterio sarà necessariamente quello più restrittivo, e quindi si dovrà garantire l'assenza di *L. monocytogenes* in 25 g di prodotto.

Sapere, con una certa sicurezza, se un prodotto si trova nella situazione 1 o nella situazione 3 è relativamente semplice; i parametri per stabilire un "confine" tra alimenti potenzialmente substrati favorevoli e alimenti non favorevoli lo sviluppo di *L. monocytogenes* vengono forniti, oltre che dai dati bibliografici, dallo stesso regolamento 2073 / 05.

Nella realtà, però, il compito dell'operatore alimentare è, nella maggior parte dei casi, molto più complesso; ci sono moltissimi alimenti che possono collocarsi in una situazione intermedia (Situazione 2); per meglio specificare, si tratta di capire come poter ottemperare a ciò che il regolamento prescrive, cioè come dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente e quindi utilizzando rigidi criteri scientifici, che un prodotto, pur essendo un substrato favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*, non lo è in modo tale da arrivare, al termine della propria vita commerciale, a contenerne più di 100 ufc/g, ovvero, vista dall'altro lato del problema, definire quali siano i limiti che il produttore debba porsi, alla fine del processo produttivo, in termini di determinazione quantitativa di *Listeria monocytogenes*, per essere ragionevolmente certo che, al termine della vita commerciale, l'eventuale presenza del microrganismo non possa superare il limite di 100 ufc/g. Tutto questo, quindi, impone all'Operatore del Settore Alimentare di valutare accuratamente tutte le caratteristiche del proprio prodotto, finalizzato a verificare e monitorare le potenziali curve di crescita del batterio in questione, soprattutto negli alimenti che si collocano, per le loro peculiarità chimico-fisiche, in una "zona di mezzo" rispetto a quelle indicate in tabella; tale risultato si può ottenere utilizzando il "Challenge test".

## **2.3 CHALLENGE TEST**

Il *Challenge Test* è una prova microbiologica eseguita per valutare la capacità di un alimento di sostenere lo sviluppo di microrganismi di riferimento (patogeni o indici di scarsa igiene), o per verificare gli effetti di un processo produttivo sulla sopravvivenza o mortalità di tali microrganismi.

Entrando più nel dettaglio, possiamo quindi dire che il *Challenge Test* è uno studio atto a verificare se, come ed in quali particolari condizioni un determinato microrganismo possa svilupparsi su una certa matrice. Il test può essere considerato quindi sotto una duplice chiave di lettura: la prima è quella dello studio delle caratteristiche di un alimento sotto l'aspetto matriciale, cioè lo studio delle caratteristiche chimico-fisiche del prodotto in funzione della possibilità di permettere la crescita di determinati tipi di microrganismi; la seconda è quella dello studio della capacità di microrganismi diverso per genere, per specie o per biotipo di crescere in un alimento con certe caratteristiche compositive e strutturali. Il *Challenge test* può essere utilizzato sia per valutare una curva di crescita di un determinato o di determinati microrganismi, ma anche per valutare una curva di abbattimento quando, ad esempio, variano le caratteristiche intrinseche dell'alimento in funzione del tipo di lavorazione o delle condizioni di conservazione.

Queste prove servono anche per determinare la *shelf life* di un prodotto finito (nel caso ad esempio di un prodotto "nuovo" per il quale la *shelf life* sia ancora da verificare), o per rivalidare la *shelf life* precedentemente determinata di prodotti già in commercio, unitamente ad altri aspetti tecnologici. Per prodotti "nuovi" si intendono non solo quelli di nuova concezione, ma anche prodotti già esistenti per i quali siano sensibilmente variate delle condizioni tecnologiche, di produzione o di stoccaggio; inoltre, le prove di *Challenge test* servono altresì per validare altri aspetti relativi ai Processi richiamati dal Regolamento 2073/05, come ad esempio i trattamenti finalizzati alla riduzione del numero di microrganismi presenti in una materia prima, in un intermedio di lavorazione, in un prodotto finito. Per progettare un *Challenge Test* in grado di fornire informazioni sulla sicurezza di un alimento che siano soddisfacenti sia dal punto di vista del produttore che del consumatore, e che siano soddisfacenti per l'Autorità Sanitaria competente, diventa fondamentale studiare e conoscere il più dettagliatamente possibile le caratteristiche del prodotto, la tecnologia del processo produttivo, le eventuali condizioni di maturazione,

conservazione o stoccaggio del prodotto, le modalità di confezionamento, di distribuzione, di vendita, di preparazione e di consumo.

Per effettuare un *Challenge Test* si possono utilizzare alimenti sicuramente contaminati, naturalmente o artificialmente (cioè inoculando i microrganismi di riferimento nelle materie prime o nei prodotti finiti) per poter stabilire se ed in quali condizioni possano arrivare a rappresentare un potenziale rischio per la qualità igienica dei prodotti e per la salute dei consumatori. Nel caso di contaminazione artificiale di alimenti altrimenti considerati e/o verificati esenti dal microrganismo, è possibile stabilire con accettabile precisione l'entità dell'inquinamento di partenza, utilizzando materiale a titolo noto di microrganismi oggetto del test. Si deve quindi effettuare una preliminare analisi dei pericoli (raccolta delle informazioni, documentali o analitiche, per identificare gli agenti microbici associati al processo) ed una valutazione dei rischi, cioè delle possibilità e probabilità che germi pericolosi possono avere di crescere in un prodotto.

Fare un *challenge test* (prova di inoculazione sperimentale) significa inserire intenzionalmente sulla superficie o all'interno di un alimento una determinata quantità di un microrganismo o di un composto chimico e poi seguire analiticamente il loro destino nel corso delle successive fasi di manipolazione e/o di conservazione.

La quantificazione del microrganismo o del composto chimico oggetto di studio consentono di tracciare un andamento che documenta il comportamento del germe o del residuo chimico in quella specifica matrice alimentare, alle condizioni previste dallo sperimentatore utile poi all'operatore del settore alimentare per avere le informazioni necessarie, richieste dal già menzionato Reg.2073/2005, sull'alimento che produce.

In quest'ottica, il *challenge test* assume un ruolo determinante perché viene a costituire una garanzia di innocuità degli alimenti per la salute umana. Di conseguenza, le industrie alimentari sono chiamate sempre più sovente a porlo in atto, specialmente dopo la definizione dei criteri di sicurezza per quei gruppi di alimenti che potenzialmente sono più a rischio di altri di indurre malattia alimentare nell'uomo.

A fronte del rilievo che il *challenge test* ha assunto nell'ottica della qualità igienico sanitaria degli alimenti, va però sottolineato che al momento le idee su cosa sia un vero *challenge test* sono ancora piuttosto confuse, a partire dalla corretta traduzione del termine.

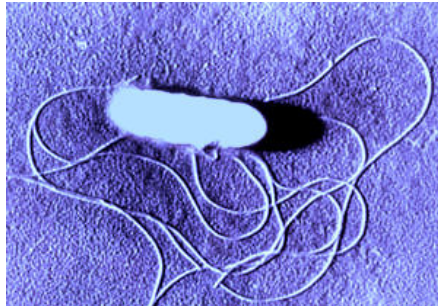
Da molti conosciuto come "prove di contaminazione sperimentale" e chi, invece, traduce *challenge test* con "prove di inoculazione sperimentale".



Fondamentale è che si riescano ad avere conoscenze più chiare su come si debba pianificare ed eseguire un vero challenge test, perché sui risultati di queste prove di inoculazione sperimentale gli OSA dovranno poi impostare i loro controlli aziendali interni. Per l'OSA è essenziale capire bene che cosa deve essere un vero *challenge test*, perché sbagliandone l'impostazione si rischia di ottenere dati errati sul comportamento del microrganismo o del composto chimico oggetto di prova.

## 2.4 LISTERIA MONOCYTOGENES E LISTERIOSI

### 2.4.1 IL GENERE LISTERIA: CARATTERISTICHE.



*Listeria* è un batterio bastoncellare Gram positivo, tendenzialmente anaerobio: vive e moltiplica più attivamente in assenza o carenza di ossigeno, è mobile, non sporigeno e nettamente psicrotrofo: in condizioni di laboratorio, duplica tra  $-1^{\circ}$  e  $50^{\circ}\text{C}$ , con un *optimum* di temperatura di sviluppo a  $30-37^{\circ}\text{C}$ , e in intervalli di pH compresi tra 4,0 e 9,5. A temperature prossime a  $0^{\circ}\text{C}$  anche le listerie, ovviamente, rallentano gli atti di duplicazione. Tra i batteri patogeni non sporigeni è considerato quello più termoresistente: occorrono almeno 15" a  $72^{\circ}\text{C}$  per inattivarla; alotollerante riesce a moltiplicare fino a concentrazioni di sale di 8-10% ( $A_w$  minima di crescita: 0,900-0,880).

Biochimicamente, *L. monocytogenes* è emolitico, catalasi positivo e ossidasi negativo.

Non riduce i nitrati, non produce idrogeno solforato, fermenta glucosio, fruttosio, mannosio, galattosio, cellobiosio, trealosio e saccarosio con la conseguente produzione di acidi.

*Listeria monocytogenes* ha una spiccata resistenza a condizioni ambientali sfavorevoli pure essendo asporigeno e sprovvisto di capsula.

La resistenza di *L. monocytogenes* e delle altre Listerie alle condizioni del substrato varia sensibilmente secondo lo stadio vitale in cui il batterio si trova. Quando sono in fase di attiva duplicazione, le listerie sono molto sensibili agli stress di qualunque tipo; viceversa, quando entrano in fase di crescita stazionaria (detta di VBNC *Viable But Not Culturable cell*) diventano molto più resistenti a condizioni subletali di pH,  $A_w$  e/o temperatura ambientale. Queste forme batteriche dalla morfologia modificata compaiono quando il

batterio viene sollecitato da degli stress subletali che ne inducono una qualche reazione fisiologica e, appunto, morfologica.

Il genere *Listeria* annovera sei specie: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi*. Di norma, sono bacilli regolari (0,5 x 1,0 µm), ma sono stati descritti occasionalmente ceppi filamentosi che possono raggiungere i 100 micron di lunghezza, delle quali si ammette che soltanto *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* siano patogene per gli animali e che la sola *L. monocytogenes* sia patogena anche per l'uomo, di solito per via alimentare.

In veterinaria sono ormai numerosi i casi di listeriosi animale segnalati in Gran Bretagna sostenuti da *L. ivanovii*, specialmente negli ovini, caratterizzati per lo più da episodi di meningoencefalite e/o aborto delle pecore gravide. In bibliografia troviamo anche rare segnalazioni di casi di listeriosi animale sostenuti da *L. innocua* (McLauchlin *et al.*, 2004). È quindi probabile che nei prossimi anni *L. ivanovii*, *L. seeligeri* e (forse) *L. innocua* divengano degli *emerging pathogen*. Dal canto suo *L. monocytogenes* può essere inserita a buon diritto fra gli *evolving pathogen* visto che si sta adattando a moltiplicare in condizioni ambientali avverse e sta diventando sempre più antibiotico-resistente.

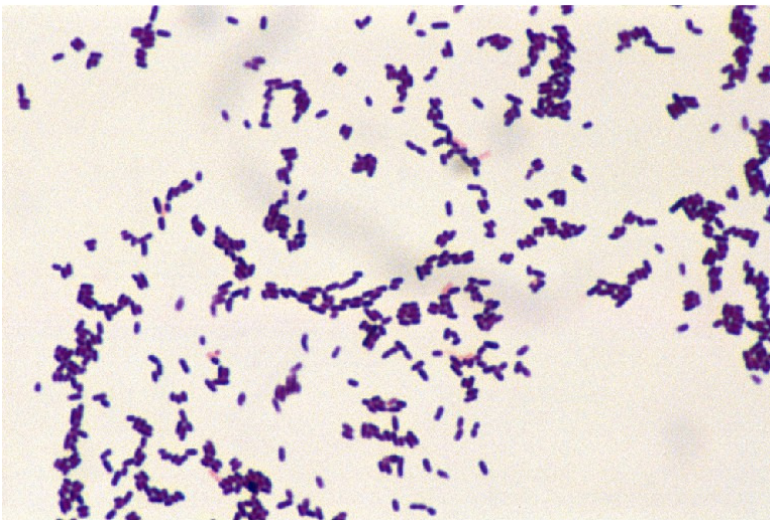


Immagine al microscopio ottico di *Listeria monocytogenes*.

Si presenta come un corto bacillo Gram positivo di 0,4-0,5 X 0,5-2,0 µm, esile, isolato o disposto in coppie parallele o riunite ad angolo, a forma di V o di brevi catene, dritto o leggermente incurvato.

**TABELLA 5.** Principali caratteristiche del genere *Listeria*

<b>Classificazione e principali caratteristiche del genere <i>Listeria</i></b>
Famiglia: Listeriacee, genere <i>Listeria</i>
Sei specie: <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. ivanovii</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. seeligeri</i> , <i>L. welshimeri</i> , <i>L. grayi</i>
Piccoli bastoncini regolari (0,5 x 1,0 $\mu$ ), Gram positivi, mobili per flagelli peritrichi
Non sporigeni, anaerobi facoltativi
Nettamente psicrotrofi, duplicano tra -1° e 50°C e in intervalli di pH compresi tra 4,0 e 9,5
Tra i batteri non sporigeni sono quelli più termoresistenti: occorrono almeno 15 secondi a 72°C per inattivarli
Alotolleranti, moltiplicano fino a concentrazioni di sale pari a 8-10% ( $a_w$ minima di crescita: 0,900-0,880)

## 2.4.2 FATTORI DI VIRULENZA

La virulenza di *Listeria monocytogenes* è connessa alla capacità di sintetizzare una serie di sostanze che gli permettono di invadere le cellule dell'ospite. Questa capacità è codificata nel genoma del batterio.

Studiosi francesi, Johansson e coll. (2002) hanno scoperto che il batterio è in grado di sintetizzare una serie di proteine che lo mettono in grado di invadere lentamente le cellule dell'ospite e di lederle: due proteine di invasione (*InlA* e *InlB*, coi rispettivi geni che le codificano, *inlA* e *inlB*), un'emolisina (la listeriolisina O - LLO) e due fosfolipasi (*PlcA* e *PlcB* coi rispettivi geni di virulenza, *plcA* e *plcB*).

L'espressione di questi geni è massima a 37°C, mentre è inibita se la temperatura ambiente scende a 30°C. La sintesi di queste proteine è sotto il controllo di uno specifico "regolatore trascrizionale", il PrfA, una proteina di 233 aminoacidi che fa parte della famiglia degli attivatori di trascrizione. L'attivazione del PrfA richiede che esso si leghi a una sequenza palindromica di 14 bp presente sui promotori regolati del PrfA, il cosiddetto PrfA-box. La bassa espressione dei geni di virulenza a temperature inferiori ai 30°C coincide con l'assenza della proteina PrfA, anche se il gene che ne codifica la sintesi (il *prfA*) continua a essere trascritto, seppure in misura più ridotta. A queste temperature il *prfA* è trascritto dal suo promotore stesso, mentre a 37°C la trascrizione prende il via sia dal promotore *prfA* che da un altro promotore, il *plcA*-PrfA dipendente. Il meccanismo che è alla base di questo differente comportamento era rimasto sinora piuttosto oscuro. Gli autori francesi sopra citati, propongono un meccanismo, basato sull'attività di un segmento di RNA messaggero specifico, che a basse temperature sembrerebbe legarsi ad una particolare struttura ancora sconosciuta, risultando inattivo, quest'ultima ad alte temperature si stacca dal sito di legame permettendo la sintesi della PrfA e, di conseguenza, l'attivazione dei geni di virulenza.

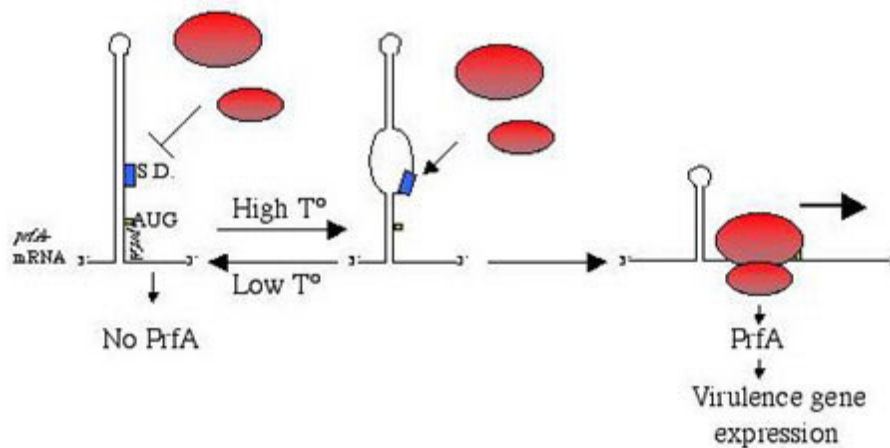


Immagine tratta dal sito <http://www.pasteur.fr>

Recentemente, si sono scoperti altri meccanismi grazie ai quali *L. monocytogenes* può superare la barriera gastrica e sopravvivere nell'intestino umano. Queste due proprietà sono essenziali per la sopravvivenza del batterio e sono la causa della condizione di portatore asintomatico nell'uomo. Per adattarsi ai valori di pH troppo acidi, *L. monocytogenes* può mettere in atto, come sappiamo, differenti meccanismi: può agire sulla sua membrana cellulare, modificandone gli scambi ionici a proprio favore, per eliminare verso l'esterno un eccesso di protoni; ma può anche utilizzare un sistema di glutammato-decarbossilasi (GAD), quando la cellula si trova esposta in un mezzo a pH troppo acido, il sistema GAD converte una molecole di acido glutammico esterna alla cellula in una di acido gamma-idrossibutirrico (GABA), utilizzando un suo protone interno. L'effetto finale è quello di impegnare una serie di protoni intracellulari in questo sistema e diminuirne la concentrazione intracellulare, alcalinizzando nel contempo il mezzo esterno, considerata la minor acidità del GABA rispetto all' acido glutammico. La valutazione dei livelli di attività del sistema GAD nei vari ceppi di *L. monocytogenes* può essere, quindi, un sistema per valutare indirettamente la capacità del singolo ceppo di adattarsi in misura più o meno accentuata a un'acidificazione del substrato.

Esiste un secondo sistema enzimatico, denominato BSH (*Bile Salt Hydrolase*, idrolisi dei sali biliari), grazie al quale *Listeria monocytogenes* è in grado di idrolizzare il legame amidico dei sali biliari coniugati, liberando acidi biliari che sono hanno un potere emulsionante molto inferiore a quello dei precedenti e che, di conseguenza, hanno effetto batteriostatico e battericida molto più basso. L'esistenza di questo secondo sistema

enzimatico nelle cellule di *L. monocytogenes* giustifica la capacità del microrganismo di sopravvivere anche nel contenuto intestinale e persino all'interno della vescichetta biliare. Sempre i francesi Olier e coll. (2004) hanno valutato questo secondo sistema enzimatico, ma non sono emerse correlazioni significative tra l'esistenza di questo sistema e l'origine del ceppo. In altri termini, non si sono notate variazioni di rilievo tra i ceppi di origine umana e quelli isolati dagli alimenti. Verosimilmente, ciascun ceppo di *L. monocytogenes* possiede questo sistema, ma ci sono livelli di attività variabile da un ceppo all'altro. L'attivazione di questo sistema enzimatico è sempre sotto controllo del già menzionato fattore di attivazione PrfA.

### 2.4.3 DIFFUSIONE DI *LISTERIA* SPP. E *L. MONOCYTOGENES* NELL'AMBIENTE

*L. monocytogenes* è, per definizione, un microrganismo ubiquitario, ossia è diffuso dappertutto nell'ambiente che ci circonda e sono, quindi, svariate le fonti di inquinamento per gli alimenti. Si può isolarlo da terreno agricolo e acque superficiali; è presente nei foraggi insilati usati per nutrire gli animali da reddito e, di conseguenza, si rinviene nel loro contenuto intestinale e da lì passa con facilità alle loro deiezioni che, utilizzate per concimare i campi, favoriscono (insieme alle acque di scorrimento superficiale usate per l'irrigazione) l'inquinamento dei foraggi e dei vegetali destinati al consumo umano. Tramite il pulviscolo atmosferico, le materie prime, gli animali, le materie prime da essi ricavate (latte e carni), l'uomo stesso con vestiti e scarpe, il batterio può penetrare con estrema facilità all'interno delle industrie alimentari e colonizzare vari settori della linea produttiva, passando dalle pareti di ambienti di lavoro e frigoriferi alle maniglie delle porte e di lì alle mani degli operatori, ai tavoli di lavoro, agli utensili, ecc.. L'uomo in sé riveste un ruolo del tutto specifico come veicolo attivo, oltre che passivo, di alcuni batteri agenti di malattia alimentare (quali *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*). Secondo Rocourt e coll. (2000), si può stimare che dal 2% al 10% della popolazione umana sia portatore asintomatico di *L. monocytogenes* nel contenuto intestinale, ma non è ancora noto quale pericolo ciò costituisca per il portatore stesso. L'infezione endogena è plausibile, ma presuppone di solito l'intervento di eventi che provocano un calo delle difese immunitarie, locali o generali, del soggetto. Dati precedenti, riportati da Jensen (1993), citavano valori più contenuti per le persone immunocompetenti (dal 2% al 6% della popolazione sana). Questa percentuale cresce, ovviamente, tra le persone colpite da forme di listeriosi sporadica (il 21% dei pazienti nei primi stadi di malattia eliminava almeno 10.000 listerie per grammo di feci) e tra conviventi di persone affette da listeriosi. Il batterio non è stato, invece, isolato da tamponi oro-faringei di persone sane e la sua presenza in tamponi vaginali è sempre associata a listeriosi.

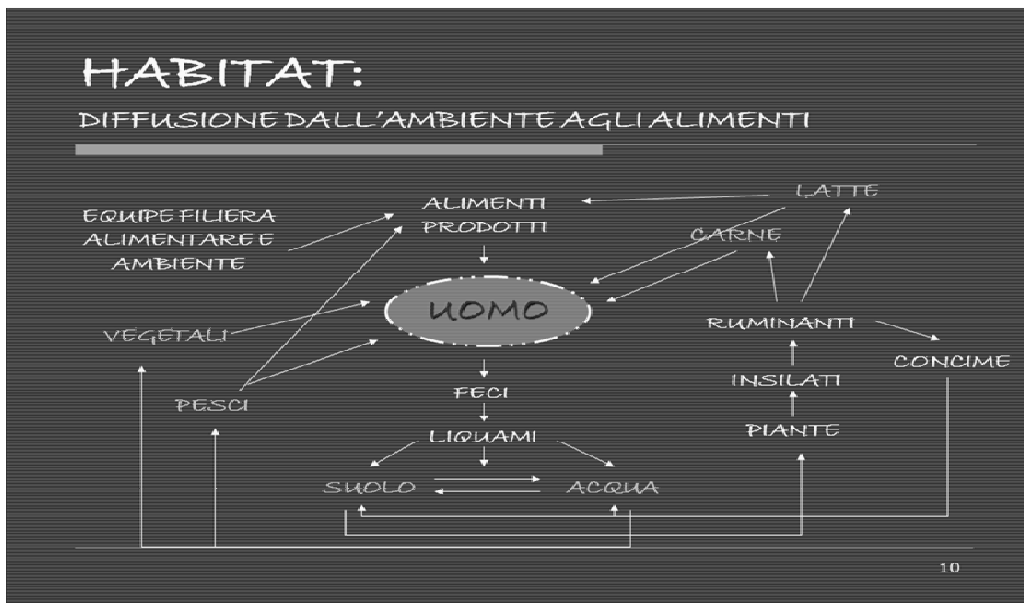
*Listeria monocytogenes* come già detto si può ritrovare negli impianti di lavorazione alimentare, nei centri di cottura ed è ospite frequente di frigoriferi e congelatori domestici: la persistenza di *Listeria* può essere favorita dalla sua capacità di attaccarsi alle superfici e di formare *biofilm* che le conferiscono una protezione verso i detergenti battericidi (<http://www.antropozoonosi.it/malattie/tossinfezioni/tossinfezioni.php>).



Le industrie alimentari delle carni e del pesce risultano spesso contaminate, sia a livello ambientale che di materie prime. Uno studio recente su impianti di affumicamento del pesce ha rilevato che 150 tamponi ambientali su 512 erano positivi (<http://sicurezzadeglialimenti.it/listeria>). In un altro studio, riguardante la lavorazione della carne di suino è stato dimostrato che il 73% dei campioni prelevati dalle attrezzature, l'83% di quelli dei pavimenti e il 100% di quelli dei nastri trasportatori risultavano contaminati.

Essendo un microrganismo ubiquitario, è molto difficile eliminarlo completamente, l'unico mezzo di prevenzione realmente valido è il rispetto delle norme di buona prassi lavorativa e delle regole di igiene durante le varie fasi del processo produttivo.

**TABELLA 6.**



## 2.4.4 LISTERIA E ALIMENTI

Le matrici alimentari contaminabili da *Listeria* sono numerose: prodotti di origine animale, in particolare formaggi molli, latte crudo, o pastorizzato in maniera incompleta, gelati, carne pronta al consumo (es. pat ), carne cruda, salumi crudi, pollame crudo, prodotti della pesca e dell'acquacoltura crudi, in salamoia e affumicati. Anche prodotti vegetali, in particolare le verdure, possono essere contaminate. *Listeria monocytogenes* non altera le caratteristiche organolettiche dei cibi. Frequente la contaminazione crociata: tra carni e vegetali, cibi crudi e cotti, per mancata applicazione delle buone pratiche di igiene e lavorazione.

### TABELLA 7. Listeria e alimenti

#### **Alimenti pi  sovente causa di listeriosi umana**

Tutti gli alimenti consumati crudi o poco cotti (carni, latte, prodotti ittici, ortaggi e frutta) o che, dopo cottura, hanno subito un successivo inquinamento e non sono consumati in breve tempo.

In particolare, si citano carni avicole fresche, latte crudo o mal pastorizzato; prodotti di salumeria e prodotti lattiero-caseari freschi o poco stagionati; prodotti ittici freschi o poco salati e affumicati, da consumare senza ulteriore cottura; prodotti di gastronomia a base di maionese e simili, da consumare senza ulteriore cottura.

#### **Alimenti di rado causa di listeriosi umana**

Tutti i cibi ben cotti, consumati entro breve tempo dopo la cottura.

Latte trattato termicamente, yogurt e altri latti fermentati, formaggi a pasta dura e stagionati, cioccolato, marmellate e dolci secchi.

Carote, mele e pomodori crudi, per la loro capacit  di inattivare il batterio (contengono ciascuno un polipeptide che sembra in grado di frenare efficacemente la proliferazione delle listerie).

### Prodotti carnei e principali casi clinici correlati

In uno studio condotto in Veneto nel 2003 sono stati valutati livelli di contaminazione di *Listeria Monocytogenes* in insaccati freschi e stagionati prelevati al dettaglio dalla grande distribuzione, dalle macellerie e dalle salumerie del territorio al fine di stabilire il livello di esposizione del consumatore a questo patogeno. Su 325 campioni di insaccati freschi e 250 stagionati si è riscontrata una percentuale di positività del 40,3% negli insaccati freschi (salsicce e salami), e del 15,4% in quelli stagionati pronti al consumo. Le quantità riscontrate negli insaccati stagionati sono risultate tuttavia contenute (<10 ufc/g) (Mioni et al., 2004).

Gli esiti di un campionamento effettuato a Ravenna nel 2003 su prodotti a base di carne freschi e stagionati prelevati anch'essi al dettaglio, hanno confermato ulteriormente i dati riportati dagli altri autori. Anche in questo caso, infatti, si sono ritrovate forti percentuali di positività (58,88%) nelle preparazioni gastronomiche da consumarsi previa cottura (hamburger di pollo, di suino, salsicce fresche) e le carni fresche di pollo e tacchino (34,78%) e di suino (30,6%) sono risultate le più contaminate (Marzadori, 2004).

Dai dati ottenuti è preoccupante la situazione che si riscontra nei prodotti pronti per il consumo poiché significa che si sono contaminati successivamente al trattamento tecnologico, che al contrario dovrebbe servire ad eliminare i patogeni eventualmente presenti. Pur essendo le percentuali tendenzialmente alte nei prodotti crudi, la minaccia è minore perché devono ancora subire un trattamento termico.

**TABELLA 8. Principali casi clinici associati al consumo di prodotti carnei contaminati da *Listeria Monocytogenes***

ANNO	STATO	CASI CLINICI	MORTALITA' (%)	ALIMENTO IMPLICATO
1986/ 1987	Stati Uniti	16.000	25	<i>Hot-dog</i> , pollo crudo
1987/1989	Inghilterra	355	26,5	Carne spalmabile e <i>patè</i> di carne
1990	Australia	11	54,5	Carne spalmabile e <i>patè</i> di carne
1992	Francia	280	23 (22 aborti)	Lingua di maiale in gelatina
1998/1999	Stati Uniti	101	21	<i>Hot-dog</i> , Carne spalmabile
1999	Francia	32	31	Lingua di maiale
1999/2000	Francia	26	0	Lingua di maiale in gelatina
2000	Stati Uniti	29	24,1	Carne di tacchino
2002	Stati Uniti	63	11,3 (3 morti fetali)	Carne di tacchino
2002	Francia	211	-	Salumi e <i>patè</i>

#### Prodotti ittici e principali casi clinici correlati

Il patogeno è stato trovato in prodotti *ready-to-eat* come carne di granchio cotta, gamberi e pesci, da salmone affumicato a caldo, cozze, salmone e altri pesci affumicati a freddo (Jinneman *et al.*, 1999).

Il pesce affumicato a freddo è frequentemente contaminato perché, oltre a non subire trattamenti risananti durante la lavorazione, viene conservato in condizioni favorevoli allo sviluppo di *Listeria monocytogenes*. Dati recenti hanno mostrato che in 4-5% dei campioni di pesce affumicato erano positivi per *Listeria monocytogenes* e che questo era l'unico prodotto i cui campioni contenessero livelli di *Listeria monocytogenes* tra i  $10^4$  e  $10^6$  ufc/g (Gombas *et al.*, 2003).

In Italia, tra il 1990 e il 1999, 52 campioni di prodotti a base di pesce e 18 di pesce fresco sono stati trovati positivi su 280 analizzati (Gianfranceschi *et al.*, 2003).

**TABELLA 9. Principali casi clinici associati al consumo di prodotti ittici contaminati da *Listeria Monocytogenes***

ANNO	STATO	CASI CLINICI	MORTALITA' (%)	ALIMENTO IMPLICATO
1984	Nuova Zelanda	29	31	Pesce crudo
1989	Italia	1	-	Pesce
1991	Francia	1	-	Merluzzo affumicato
1994	Stati Uniti	10	10	Gamberi
1997	Svezia	9	-	Trota iridea affumicata a freddo
1998	Nuova Zelanda	4	-	Cozze
1999	Finlandia	5	-	Trota affumicata

### 2.4.5 LA CARICA INFETTANTE

Per *L. monocytogenes* i dati a nostra disposizione sulla carica infettante sono stati essenzialmente desunti in base alle cariche del batterio riscontrate negli alimenti che sinora sono stati causa di listeriosi occasionale o sistemica. Si ritiene che *L. monocytogenes* puo dare origine a un episodio epidemico o sporadico di malattia quando e assunta, insieme con un alimento, in cariche che vanno da un minimo di 100-1.000 ufc/g di fino a 100 milioni di ufc/g. Quanto piu e elevata la quantita del batterio al momento dell'assunzione dell'alimento, tanto maggiori sono le probabilita che la persona contragga la listeriosi.

Gli alimenti appena prodotti sono inquinati con cariche quasi sempre molto contenute del microrganismo: meno di 10 e a volte meno di 1 ufc/g. Secondo alcuni autori, nel 90% dei casi *L. monocytogenes* arriva a inquinare un alimento in cariche iniziali che mediamente sono pari a 0,04-0,1 ufc/g di prodotto.

Per raggiungere le cariche necessarie per scatenare una listeriosi clinicamente evidente, occorre che i pochi batteri inizialmente presenti nell'alimento riescano a moltiplicare. Diventano dunque decisivi i fattori propri dell'alimento (pH, frazione di acqua libera, presenza o assenza di ossigeno nella confezione, temperatura di conservazione o trattamento termico) che possono influenzare positivamente o negativamente la crescita del batterio.

E su questa serie di dati di fatto che gli estensori del Reg. CE n. 2073/05 hanno impostato i criteri di sicurezza per gli alimenti pronti. In particolare, quanto riportato sopra giustifica perché gli esperti abbiano annoverato fra gli alimenti che "non costituiscono terreno favorevole per la crescita" del batterio gli alimenti pronti che hanno meno di 5 giorni di durabilità commerciale, indipendentemente dal valore di pH e/o di  $A_w$ . Si ammette, infatti, che in quel breve lasso di tempo e a temperatura di refrigerazione sia ben poco probabile che il batterio riesca a duplicare così attivamente da superare la soglia delle 100 ufc/g considerata come criterio di sicurezza.

In tema di carica infettante specifica, dunque, si può concludere che:

(1) una persona può sviluppare una listeriosi clinicamente evidente se ingerisce un alimento che contiene una carica di *L. monocytogenes* che può oscillare da meno di 1.000 fino a oltre  $10^8$  ufc/g

(2) nelle persone appartenenti a una delle categorie "a rischio" è probabile che sia sufficiente una carica microbica anche relativamente bassa per scatenare la sindrome tossica; la medesima carica potrebbe essere ben tollerata da un essere umano in buone condizioni di salute iniziali

(3) a parità di carica microbica infettante, è probabile che sulla comparsa della listeriosi clinica intervengano fattori quali la virulenza del batterio e le caratteristiche compositive dell'alimento

(4) gli studi epidemiologici condotti in questi ultimi venti anni evidenziano che spesso gli alimenti fonte di listeriosi umana sono stati sottoposti a un trattamento termico di cottura e/o a successive manipolazioni. Questi trattamenti da un lato annullano la flora microbica tipica delle materie prime, dall'altro consentono a *L. monocytogenes* di inquinare la matrice alimentare.

In genere si tratta sempre di alimenti che sono poi consumati senza ulteriore cottura o riscaldamento, in grado di supportare la moltiplicazione del batterio e con una *shelf-life* piuttosto lunga (superiore ai 30 giorni).

*L. monocytogenes* non è un buon competitore e nel suo sviluppo è quasi subito scavalcata dalla proliferazione di una flora microbica banale, non patogena. Se è mescolata ad altri microrganismi tipici dell'ambiente esterno, il germe stenta a moltiplicare e a raggiungere cariche elevate. Vice versa, il batterio riesce a proliferare con notevole velocità quando si trova a essere praticamente l'unico componente della flora microbica di un alimento.

Si tratta di un comportamento non sempre univoco: in alcuni episodi di listeriosi epidemica si è accertato che il batterio aveva potuto moltiplicare anche in presenza di una flora microbica associata.

## 2.4.6 LA LISTERIOSI

### 2.4.6.1 PATOLOGIA



Appartenente ad un gruppo di malattie definite come "infezioni alimentari", la listeriosi è una patologia contagiosa, grave compresa nel gruppo delle zoonosi, nel cui ambito, a causa proprio della sua gravità, riveste un ruolo importante.

Nonostante evidenze della malattia siano state descritte fin dalla fine dell'800 in diversi animali, il primo caso umano è stato riportato nel 1929.

Nei paesi occidentali, la malattia sta assumendo sempre più una dimensione problematica per la sanità pubblica, sia per la sua potenziale gravità sia per il fatto che epidemie si sono manifestate anche in anni recenti nei nostri paesi, soprattutto in seguito alla diffusione di cibo contagioso attraverso le grandi catene di distribuzione.

Il contagio si realizza per contatto diretto con i secreti ed escreti di animali infetti sia direttamente che indirettamente per inalazione di polvere o di altro materiale contenente il patogeno oppure più frequentemente in seguito all'ingestione di prodotti di origine animale inquinati.

Da menzionare l'eventualità di un contagio interumano, considerata la frequente reperibilità di *Listeria monocytogenes* nelle feci di persone sane, comprese donne gestanti e nell'apparato genitale femminile.

Il quadro clinico è generalmente polimorfo, in rapporto alle diverse modalità di infezione e allo stato immunitario del soggetto.



La listeriosi può assumere due forme:

- forma **non invasiva** o diarroica più tipica delle tossinfezioni alimentari, che si manifesta nel giro di poche ore dall'ingestione (12-24 ore), la dose ingerita deve essere alta, i sintomi sono quelli tipici di una gastroenterite febbrile (sintomi gastroenterici con diarrea, febbre, cefalea e mialgia);
- forma **invasiva** o sistemica: che al contrario presenta un periodo di incubazione molto lungo (dalle 2 alle 3 settimane, occasionalmente a 3 mesi) e le dose infettante molto bassa.

Quest'ultima si manifesta in seguito alla penetrazione e moltiplicazione del batterio nella mucosa intestinale e alla sua diffusione per via ematogena al fegato, all'utero gravidico ed al sistema nervoso centrale.

Durante i primi 10 giorni di malattia i sintomi che si presentano sono comuni alle altre tossinfezioni alimentari: febbre persistente, dolori muscolari, nausea, diarrea.

Successivamente alla compromissione sistemica si avranno emicrania, confusione, irrigidimento del collo, perdita dell'equilibrio e convulsioni (<http://www.epicentro.iss.it/problemi/listeria/listeria.asp>).

Le forme invasive più frequenti di listeriosi sono 3:

- Forma meningoencefalica: oltre che i soggetti in giovane età, colpisce gli adulti ed è considerata una delle forme più temibili di listeriosi. Il quadro clinico è quello di un'encefalite, accompagnata o meno da sintomi meningei. L'esordio è improvviso con cefalea, vomito, senso di vertigine; la febbre sale rapidamente e in breve compaiono i segni bulbari che evolvono fatalmente in 2-6 giorni. La mortalità oscilla tra il 50 e il 75%. Nei casi non letali si hanno spesso reliquati permanenti come paralisi, idrocefalo, ecc. L'esame autoptico evidenzia un'encefalite caratterizzata dalla presenza di numerosi noduli disseminati con modico interessamento meningeo.



- Granulomatosi infantiseptica o listeriosi neonatale: avviene conseguentemente all' infezione transplacentare. Le manifestazioni cliniche non hanno nulla di caratteristico per cui vengono spesso interpretate come conseguenza di debolezza generale, aspirazione di liquido amniotico, disturbi nella digestione. Talora il neonato appare

sano subito dopo la nascita, ma ammalata dopo pochi giorni in forma acuta e letale. La mortalità è elevatissima, raggiungendo spesso il 90-100%.

L' infezione del feto in utero è ovviamente preceduta da infezione della madre in gravidanza. Nelle gestanti la listeriosi decorre con fenomenologia vaga (stato similinfluenzale, febbre di breve durata, pielocistite, meningite) oppure del tutto asintomaticamente. Eventi frequenti sono rappresentati anche da aborto e morti natalità.

- Granulomatosi settica e forma tifo-pneumonica: queste forme di listeriosi viscerale, frequenti nell'adulto, si rivelano con sintomi settici e con prevalente compromissione del fegato, della milza e dei polmoni nei quali si formano i caratteristici granulomi miliari.

Quando l' infezione si stabilisce per via aerogena, prevalgono fatti bronco pneumonici, ai quali può associarsi empiema pleurico e seguire una localizzazione meningoencefalica; negli altri casi predomina una sindrome epatosplenica. Non sono rari i casi in cui si osservano processi endocardici e polisierositi. La mortalità è compresa fra il 30 e il 50%.

Oltre a queste tre forme ne sono state osservate e descritte altre meno comuni. Esse sono: la forma oculoghiandolare, caratterizzata da congiuntivite purulenta con risentimento dei linfonodi regionali; la forma cervicoghiandolare, nella quale si osserva tumefazione e successiva suppurazione dei linfonodi cervicali; la forma anginoso-settica, a decorso relativamente benigno; la forma esantemica, dominata da un eritema papuloso.

#### 2.4.6.2 PATOGENESI

La patogenesi della listeriosi dipende principalmente dalla capacità di *Listeria monocytogenes* di invadere, replicarsi e sopravvivere all'interno di differenti tipi cellulari che includono cellule non-fagocitiche e macrofagi.

In tutti i tipi cellulari, l'internalizzazione del batterio è rapidamente seguita dalla lisi del vacuolo fagocitico ad opera della listeriolisina O (LLO) batterica, che consente la liberazione del batterio nel citosol.

In questo compartimento, *Listeria* si replica e si sposta utilizzando le proteine contrattili della cellula ospite. ActA è stata identificata quale proteina di superficie batterica responsabile del movimento intracellulare; essa mima l'attività delle proteine WASP ("Wiskott Aldrich Syndrome Protein"), fattori di nucleazione dell'actina, inducendo la polimerizzazione dell'actina e la formazione di strutture note come "actin comet tails" che consentono il movimento nel citosol cellulare. Il batterio raggiunge la membrana cellulare e mediante la formazione di pseudopodi, o più precisamente "listeriopodi", viene rilasciato nelle cellule adiacenti diffondendosi in tutto l'organismo.

Sono stati identificati diversi geni e proteine direttamente coinvolti nelle varie fasi del processo infettivo. In particolare, il sequenziamento dell'intero genoma di *Listeria monocytogenes* ha consentito di identificare due "clusters" di geni necessari per l'invasione e la replicazione intracellulare.

Il primo "cluster" identificato si riferisce a "l'isola di patogenicità 1 di *Listeria monocytogenes* (LIPI-1)", codificante per un set di geni coinvolti nell'infezione di cellule e tessuti, nel superamento da parte del batterio dei vacuoli fagocitici, nella replicazione citosolica, nella motilità actinica e nella diffusione cellulare.

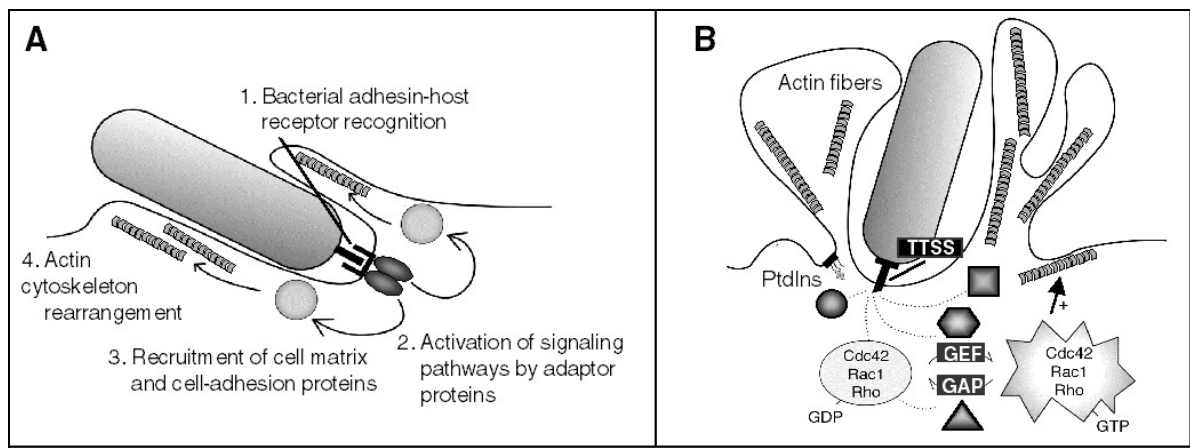
Il secondo "cluster" comprende, invece, solo due geni che formano un operone, *InlA* e *InlB*, (Internalin-mediated *Listeria* invasion) che codificano fattori di invasione necessari per l'adesione e l'invasione cellulare in cellule non fagocitiche.

Esse sono proteine superficiali batteriche che vanno a costituire il complesso proteomico superficiale noto come "surfaceome", la cui caratterizzazione ha permesso di comprendere meglio la capacità di sopravvivenza di questo patogeno in diversi ambienti, quali alimenti e citosol di cellule.

*Listeria monocytogenes* appartiene a quei batteri patogeni che nel corso del tempo hanno evoluto diverse strategie per colonizzare nicchie intracellulari eucariote.

Sono stati differenziati due meccanismi di ingresso utilizzati dai patogeni:

- meccanismo "trigger": secondo il quale proteine batteriche effettrici vengono iniettate nel citosol della cellula ospite inducendo drammatici riarrangiamenti citoscheletrici che consistono nella formazione di filopodi e lamellipodi a livello del sito di contatto dei batteri con la superficie cellulare dell'ospite eucariotico, culminando con l'ingresso del batterio nella cellula ospite;
- meccanismo "zipper" o "penetrazione mediata dal recettore": secondo il quale i batteri si legano mediante le loro adesine alle membrane delle cellule ospiti, in particolare, con i recettori della superficie delle cellule ospiti coinvolti nelle adesioni cellula-cellula e cellula-matrice e/o nell'attivazione di proteine regolatrici che modulano il "turnover" del citoscheletro. Queste proteine sono spesso connesse a cascate di segnali attivate da fosforilazioni in tirosina e che conducono, tra gli altri effetti, a riarrangiamenti actinici e alla riorganizzazione delle membrane. *Listeria monocytogenes*, patogeno intracellulare facoltativo, penetra e infetta la cellula ospite secondo un meccanismo di tipo "zipper" mediato dall'InIA e dall'InIB.



*Meccanismi di penetrazione batterica.* (A) Meccanismo "zipper": i batteri si legano mediante le loro adesine batteriche ai recettori della cellula ospite attivando il "signaling" cellulare che induce un riarrangiamento actinico e una moderata riorganizzazione delle membrane. (B) Meccanismo "trigger": l'uptake batterico è indotto dall'azione di proteine batteriche effettrici che vengono iniettate nel citosol della cellula ospite mediante il sistema di secrezione di tipo III (TTSS) inducendo drammatici riarrangiamenti citoscheletrici.

Altre risposte cellulari non direttamente legate alla fagocitosi sono mediate dall'InIB; esse rappresentano eventi critici soprattutto per la sopravvivenza cellulare dopo l'internalizzazione del batterio e il suo rilascio nel compartimento citosolico.

L'InIB è in grado di attivare un'isoforma della fosfolipasi C, PLC- $\gamma$ 1, che porta alla formazione di inositolo 1,4,5 trifosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG). IP3 induce il rilascio di calcio dalle riserve intracellulari, mentre il DAG attiva gli isoenzimi appartenenti alla grande famiglia di protein chinasi C (PKC) calcio/fosfolipidi-dipendenti. Il calcio e la PKC sono entrambi coinvolti nell'invasione batterica, in particolare nelle fasi successive all'internalizzazione, quali il controllo della crescita cellulare e/o l'espressione genica.

Una strategia utilizzata dalla *Listeria*, ma comune a molti batteri patogeni, prevede la modulazione dell'attività di molecole chiave delle cellule ospiti, tra cui i recettori presenti sulla superficie della membrana cellulare e proteine che regolano il citoscheletro.

Molti batteri sono in grado di legare i recettori integrinici presenti sulla superficie delle cellule ospiti o di legarsi a proteine delle cellule ospiti che interagiscono con le integrine. L'utilizzo delle integrine come substrato permette ai batteri patogeni di sfruttare la proprietà di questi recettori di attivare le vie di trasduzione di segnali cellulari.

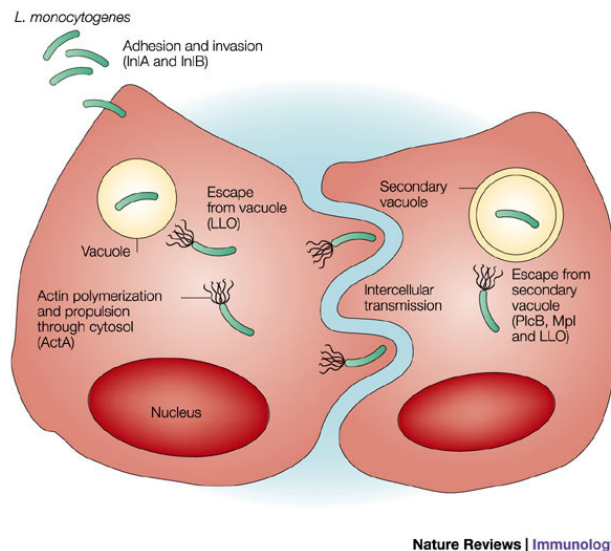
Le integrine sono glicoproteine della membrana cellulare che regolano molti processi biologici critici per la cellula, quali l'adesione delle cellule a specifiche proteine della matrice extracellulare, la migrazione, la proliferazione, il differenziamento e l'apoptosi.

Esse sono recettori eterodimerici costituiti dall'associazione non-covalente delle subunità  $\alpha$  e  $\beta$ , entrambe composte da una porzione globulare extracellulare, un segmento transmembrana e una breve coda intracitoplasmatica. Nell'uomo esistono 19 tipi di subunità  $\alpha$  e 8 tipi di subunità  $\beta$  che eterodimerizzando formano 25 differenti recettori integrinici distinti per specificità e affinità di legame.

Le integrine, in cooperazione con i recettori dei fattori di crescita, modulano le vie del segnale dall'esterno verso l'interno delle cellule e viceversa, svolgendo in tal modo un ruolo fondamentale per la sopravvivenza e la cooperazione tra le cellule dei diversi tessuti, organi e apparati dell'organismo.

Queste proteine sono altamente regolate e la localizzazione di un patogeno sulla superficie delle cellule ospiti o nel fagosoma dipende sia dallo stato di attivazione della cellula ospite, sia dal numero di recettori presenti al livello della membrana cellulare disponibili per il contatto con il batterio.

Il legame tra i batteri ed i recettori integrinici induce la stimolazione di diverse vie di trasduzione di segnali all'interno delle cellule che includono sia riarrangiamenti citoscheletrici che stabilizzano le interazioni cellula-batterio, che l'induzione di specifici trascritti cellulari che portano a conseguenze per il processo infettivo che vanno ben oltre gli effetti localizzati al sito di adesione.



Colonizzazione della cellula da parte di *Listeria monocytogenes*.

All'interno della cellula ospite, il batterio con la listeriolisina O e la fosfolipasi lisa la membrana della vescicola e si libera nel citoplasma, dove inizia a moltiplicare, grazie alla proteina ActA ciascun microrganismo si riveste di filamenti di actina, che sintetizza partendo dal citoscheletro della cellula stessa, il germe accumula i filamenti di actina contrattile a uno dei due poli, assumendo l'aspetto di una cometa e grazie alle cui contrazioni *L. monocytogenes* estroflette la membrana della cellula ospite e inflette quella della cellula adiacente, penetrandovi.

*L. monocytogenes* si trova di nuovo all'interno di un vacuolo nel citoplasma di un'altra cellula e il ciclo riprende.

Con questo sistema, *L. monocytogenes* può diffondere nell'organo passando da una cellula all'altra senza venire in contatto con i liquidi organici e quindi sfuggendo agli anticorpi dell'ospite.

### 2.4.6.3 EPIDEMIOLOGIA

La prima segnalazione del batterio è del 1924 a opera di Murray, che lo chiamò *Bacterium monocytogenes*, anche se probabilmente altri ricercatori avevano avuto modo di osservarlo. Fu Pirie nel 1940 a dare al genere il nome di *Listeria*, e al 1949 risale il primo caso di listeriosi epidemica, segnalato in Germania in pazienti neonati. Allora, il quadro clinico registrato in 85 feti abortiti o neonati subito deceduti, fu di una granulomatosi infantiseptica, e Potel isolò da tutti un batterio che lui ritenne essere un *Corynebacterium*. Fu Seeliger a riconoscere che piuttosto erano assimilabili a Listerie. Il primo a distinguere realmente *L. monocytogenes* da altre specie di listerie fu il francese Rocourt, per via biochimica e poi genomica, cominciando a capire che in realtà soltanto questa specie risultava patogena per uomini e animali, non le altre. Col passare degli anni e l'affinarsi delle tecniche di analisi immunologiche e biomolecolare, si cominciò a capire che *L. monocytogenes* è presente in vari sierotipi e che la sua virulenza è connessa alla sintesi di vari fattori, tra cui un'emolisina specifica che è chiamata listeriolisina, oltre a due fosfolipasi.

I primi ad accorgersi che la listeriosi poteva essere una malattia alimentare furono alla fine degli anni '70 i canadesi Schlech e coll. (1983), grazie purtroppo al fatto di avere potuto osservare un notevole episodio nel loro paese, sostenuto da crauti.

Da allora gli alimenti chiamati in causa come fonte di trasmissione di listeriosi sono stati molti. Sono possibile fonte frequente di listeriosi (o sovente da loro si può isolare il batterio) i salumi (come salami e paté), carni crude (in particolare quelle di pollo e tacchino), i tramezzini e analoghi, lattuga e funghi freschi, latte crudo e prodotti da esso derivati, formaggi molli (Brie, Roquefort, Camembert, Munster, ricotta e feta), prodotti della pesca (salmone soprattutto), e tutti gli alimenti che sono conservati dopo essere stati cotti. Sono invece di rado fonte di listeriosi alimenti quali: tutti i cibi consumati subito dopo cottura, latte pastorizzato e yogurt (se sono industriali), formaggi a pasta dura, stagionati, cioccolato, marmellate e dolci secchi, carote, mele e pomodori crudi per la loro capacità di inattivare le listerie.

Nel 1981 si è ufficialmente riconosciuto che *L. monocytogenes* è tra le più importanti cause di malattia alimentare dell'uomo nei paesi dell'Occidente industrializzato. Attualmente, si ammette che *L. monocytogenes* sia causa di un'importante malattia

alimentare con tassi di mortalità che possono arrivare fino al 20-30% dei soggetti colpiti, valore che supera quello di altri agenti di malattia alimentare come *Salmonella* spp. e che si avvicina a quelli del più pericoloso agente microbico sinora conosciuto dall'uomo, *Clostridium botulinum* (i cui tassi di mortalità possono andare dal 20-30% fino al 70-80% delle persone colpite). A differenza del botulismo, però, la listeriosi è una malattia alimentare piuttosto frequente: si stima che la sua incidenza tra la popolazione sia di circa 0,7-1 caso/100.000 abitanti se si prendono in considerazione le persone in normali condizioni di salute (soggetti immunocompetenti). Tuttavia, la probabilità di contrarre l'infezione listeriosa dagli alimenti è tre volte maggiore per le persone con più di 70 anni di età e sale a oltre 17 volte per le donne in gravidanza e i soggetti con indebolimento delle difese immunitarie.

Secondo il tedesco Hof (2003), l'incidenza della listeriosi (per 100.000 persone) può essere stimata nel modo seguente:

---

soggetti immunocompetenti	0,7
persone anziane (> 70 anni)	2
alcolisti e diabetici	5
ipersideremia	5
donne in gravidanza	12
pazienti affetti da neoplasia	15
terapia a base di corticosteroidi	20
pazienti con <i>lupus</i> o patologie analoghe	50
pazienti sottoposti a trapianto di rene	100
pazienti affetti da leucemia linfatica cronica	200
pazienti affetti da AIDS	600
pazienti con leucemia acuta	1000

---



L'OMS (Organisation mondiale de la Santé) l'ha definita come una malattia rara (5 casi per milione di abitanti), preoccupante risulta però l'elevata mortalità (20% per le forme invasive) e per il tasso di ospedalizzazione (90,5% dei casi) (FAO/WHO, 2004).

E' proprio per quest'ultimo motivo che l'impatto economico e sociale di questa patologia è considerato tra i più alti fra le malattie di origine alimentare.

#### **2.4.6.4 LE EPIDEMIE RECENTI**

Nel 2002, negli Stati Uniti, un'epidemia di listeriosi associata al consumo di carne di tacchino contaminata ha avuto come effetto 54 casi di malattia, 8 morti e 3 morti fetali in 9 stati diversi.

In Europa, la metà dei casi notificati sembra derivare da assunzione di prodotti lattiero caseari. Epidemie di questi tipo si sono verificate nel 1983 e nel 1987 in Svizzera, per formaggi molli non pastorizzati, nel 1986 in Austria per consumo di latte non pastorizzato, e nel 1995 in Francia, dove un tipo di Brie, sempre a base di latte non pastorizzato, è stato all'origine di una epidemia. Tuttavia, anche prodotti pastorizzati e contaminati in seguito hanno dato origine a casi di listeriosi, come è successo in Finlandia nel 1998- 99 a causa del consumo di burro contaminato. Il *Rapid alert system for food and feed* (RASFF) europeo, stabilito dalla direttiva 92/59/EEC, ha lo scopo di notificare agli stati membri quando esista un rischio associato a un certo prodotto per la salute dei consumatori. Il Rasff pubblica informazioni dettagliate sulle notifiche, le fonti di contaminazione, i prodotti e i paesi coinvolti. Le notifiche del Rasff sono di due tipi, quelle relative ai prodotti presenti sul mercato e che quindi costituiscono un rischio per i consumatori e quelle per i prodotti non ancora presenti, ritirati o bloccati. Nel rapporto 2002, le notifiche del primo caso relative a *Listeria* costituiscono il 17% del totale, mentre quelle del secondo caso il 13%.

Il bollettino *Eurosurveillance weekly* ha pubblicato in anni recenti numerose note relative a epidemie di listeriosi in diversi paesi. Il già citato caso della Finlandia, ad esempio, dove vengono registrati dai 30 ai 50 casi ogni anno, ha visto una epidemia tra il dicembre 1998 e il febbraio '99, che ha prodotto 18 malati. 16 hanno sviluppato forme di setticemia, uno è risultato affetto da una infezione al sistema nervoso centrale, uno ha sviluppato un ascesso e 4 sono morti. L'età media era di 57 anni, con un ampio range tra i 18 e gli 85 anni, e tutti erano già precedentemente malati in forma piuttosto grave.

In Germania, le infezioni di *Listeria* sono stimate tra i 50 e gli 80 casi annuali, con una notifica di 11-16 casi ogni anno. Nello stesso paese, si stima che il 4-6 per cento dei casi di meningite sia causata da *Listeria*.

In Francia, il Cnrs (Centre national de la recherche scientifique) e l'Istituto Pasteur hanno avviato un sistema di sorveglianza della listeriosi, che ha colpito il paese più volte in forma epidemica in anni recenti. Tra il 1996 e il 2002, ci sono stati tra i 216 e i 230 casi di malattia all'anno. Verso la fine di dicembre 1999, sono stati registrati 26 casi di listeriosi, con 7 morti, associati a un prodotto di gastronomia, lingua di maiale in gelatina. Nel 2002, si sono registrati 211 casi di cui 197 sporadici e due cluster di 11 e 3 casi legati al consumo di salumi e paté. Il 24% dei casi sporadici ha interessato le donne in gravidanza o i neonati (forme materno-neonatali). Nel 2003, il Cnr francese ha avviato in collaborazione con 27 laboratori europei uno studio di fattibilità per la sorveglianza microbiologica delle infezioni da *Listeria* in Europa e la creazione di un database elettronico condiviso sui profili genetici dei ceppi identificati nei diversi paesi e sui diversi cibi (progetto PulseNet Europa).

In Italia, nel maggio 1997, una epidemia di listeriosi gastroenterica derivata dal consumo di insalata di mais e tonno contaminato, utilizzato nelle insalate, ha coinvolto oltre 1500 persone. Nella maggior parte dei casi, si trattava di bambini e del personale di due scuole elementari di Torino, mentre altri casi si sono avuti tra gli studenti dell'Università della stessa città. Tutte le persone colpite dall'infezione avevano mangiato presso due caffetterie servite dallo stesso sistema di catering. Tra i malati, quasi 300 persone sono state ospedalizzate. Una analisi del Dna presente nei ceppi di *Listeria* isolati dai pazienti e nelle porzioni di insalata di tonno e mais ha confermato l'origine dell'infezione.

**TABELLA10. Principali casi di listeriosi in Europa.**

ANNO	PAESE	CASI/DECESSI	VEICOLO
1983-1987	Svizzera	122/34	Formaggio molle non pastorizzato (Vacherin Mont D'Or)
1986	Austria	-	Latte non pastorizzato
1995	Francia	-	Brie (formaggio a base di latte crudo non pastorizzato)
1997	Italia	(*)vedi allegato 01	Mais e tonno
1998	Finlandia	18/4	Burro
1999	Francia	26/7	Prodotto di gastronomia (Lingua di maiale in gelatina)
2002	Francia	211	Salumi e patè
2006	Repubblica Ceca	78	Formaggi

Allegato.01 Caso Listeriosi in Italia Maggio 1997

- ❑ 21 maggio 1997 - Moncalieri e Giaveno (TO)
- ❑ 1566 studenti universitari e bambini coinvolti
- ❑ Ricovero cautelativo in ospedale per 1/5 delle persone coinvolte
- ❑ 1 caso di disseminazione sistemica- emocoltura positiva
- ❑ Cefalea, dolori addominali, nausea, vomito, diarrea e febbre



+



**CAUSA EPIDEMIA: LISTERIA MONOCYTOGENES**

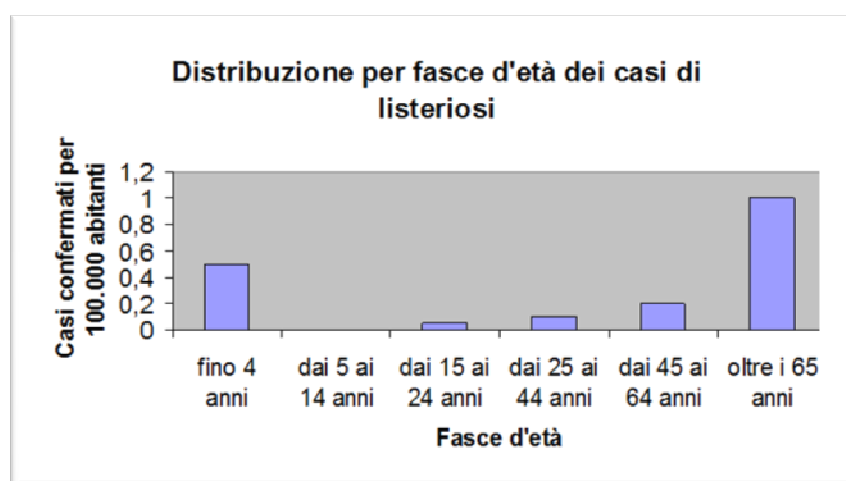
Isolato da tutti i campioni di feci, e da prelievi effettuati nelle cucine della società di catering che serviva le suddette mense scolastiche ed universitaria di Torino.  
Sterili le confezioni chiuse di tonno e mais!

## 2.4.6.5 POPOLAZIONE A RISCHIO

La listeriosi è particolarmente pericolosa per le persone immunodepresse, malati di cancro, diabete, Aids, le persone anziane, i neonati e le donne in gravidanza. Le donne in gravidanza sono, secondo i dati dei Cdc (Centers for Disease Control and Prevention) americani, 20 volte più suscettibili alla malattia, che può causare aborto spontaneo o parto prematuro, morte in utero o infezione del feto. I sintomi però, nel caso delle donne incinte, sono molto simili a quelli di una influenza leggera.

In Europa il 55,6% di tutti i casi di listeriosi sono stati riscontrati in pazienti con più di 65 anni (ESFA, 2007), quindi anche se questa malattia continua a verificarsi in associazione con la gravidanza ora è prevalentemente un'infezione che riguarda soggetti anziani immunodepressi.

**TABELLA 11. Incidenza listeriosi per fasce d'età.**



**TABELLA 12. Listeriosi: condizioni predisponenti.**

Gravidanza
Età estreme della vita
Trapianto d'organo
Neoplasie maligne
Terapia cronica con gluco-corticoidi
Diabete mellito
Epatopatie
Nefropatie
AIDS

#### 2.4.6.6 COMPORTAMENTI A RISCHIO

I comportamenti scorretti che portano a una possibile infezione sono:

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

#### 2.4.6.7 PREVENZIONE

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

- cottura completa e corretta dei cibi derivati da animali;
- lavaggio accurato delle verdure prima del consumo;
- separazione delle carni crude dalle verdure e dai cibi cotti e pronti al consumo;
- conservazione accurata dei cibi refrigerati;
- pulizia di coltelli, taglieri, superfici e mani dopo la manipolazione di cibi crudi prima della manipolazione di cibi cotti.



- In particolare, i soggetti più a rischio, come le donne in gravidanza o le persone immunodepresse, dovrebbero anche:
- consumare prodotti lattiero-caseari pastorizzati;
- consumare i prodotti deperibili in tempi brevi;

- evitare il consumo di prodotti ittici affumicati, a meno che non siano inscatolati in forme che non deperiscono a breve scadenza;
- evitare di mangiare panini contenenti carni o altri prodotti elaborati da gastronomia senza che questi vengano nuovamente scaldati ad alte temperature;
- evitare di contaminare i cibi in preparazione con cibi crudi e/o provenienti dai banconi dei supermercati e delle delicatessen;

- non mangiare formaggi molli se non si ha la certezza che siano prodotti con latte pastorizzato;
- non mangiare paté di carne freschi e non inscatolati;
- mantenere ovviamente una buona pulizia dei frigoriferi (Arcangeli, 2006; Arcangeli et al., 2003; [www.epicentro.iss.it](http://www.epicentro.iss.it)).

#### **2.4.6.8 TERAPIA**

L'infezione da *L.monocytogenes* deve essere sempre considerata nella diagnosi differenziale della meningite nei soggetti immunodepressi, in special modo nei soggetti trapiantati, nei pazienti che assumono glucocorticoidi così come nei pazienti con neoplasie ematologiche o infezione da HIV. Dal momento che *L.monocytogenes* non è sensibile alle cefalosporine, questi antibatterici non dovrebbero essere utilizzati da soli nella terapia empirica della meningite in questi pazienti.

La terapia d'elezione consiste nell'associazione di penicillina G o ampicillina con aminoglicosidi. Nei pazienti allergici alle penicilline si è dimostrato efficace l'uso del cotrimoxazolo.

## **3. PARTE SPERIMENTALE**

### **3.1 MATERIALI E METODI**

Lo scopo di queste prove è di studiare il meglio possibile il comportamento del batterio in due prodotti di gastronomia, più precisamente nel "tacchino in salsa *vinaigrette*" e nell'"insalata di mare", in modo da ottenere dati scientificamente fondati che permettano all'operatore del settore alimentare di garantire il rispetto degli obblighi di legge imposti dal Reg. CE n. 2073/2005.

La finalità essenziale di questa strategia operativa sta nel comprendere il meglio possibile se e fino a qual punto i prodotti della gastronomia esaminati possano costituire terreno adatto o non adatto alla proliferazione di *Listeria monocytogenes*.

#### **3.1.1 IMPOSTAZIONI DELLE PROVE**

Al momento non esistono linee-guida ufficiali né a livello internazionale, né comunitario o nazionale su come impostare correttamente un challenge test.

Nel programmare le prove si sono tenuti in considerazione la bibliografia specialistica esistente, riguardo al batterio, e le poche pubblicazioni in merito allo specifico argomento.

Nel programmare le prove abbiamo cercato di simulare il meglio possibile che cosa avviene nella realtà, quando cellule di *L. monocytogenes* arrivano a inquinare un alimento.

Per questo motivo, si è stabilito di inoculare cariche relativamente basse del batterio.

Per il tacchino in salsa vinaigrette si è deciso di inoculare una carica compresa tra 0,1-1 ufc/g, per l'insalata di mare invece ci siamo prefissati di inoculare, due cariche del batterio che fossero comprese tra 1-10 ufc/g e, rispettivamente, 10-100 ufc/g.

È opportuno sottolineare, a questo proposito, che secondo alcuni recenti studi (Bartholomew *et al.*, 2005; Francois *et al.*, 2007; Hwang e Marmer, 2007) la carica inquinante iniziale di *L. monocytogenes* negli alimenti è per lo più molto bassa, compresa nell'ordine di 1-0,01 cellule/g di alimento, con una media stimata di 0,04 cellule/g di prodotto.

Le cariche scelte per l'inoculazione sperimentale erano volutamente superiori alle possibili cariche inquinanti iniziali per due motivi:

- con cariche batteriche iniziali inferiori a 10 ufc di *L. monocytogenes* per grammo di prodotto si rischiava di non rilevare la presenza del batterio nei terreni di coltura e, quindi, di non potere delineare con sufficiente precisione il suo comportamento durante la conservazione del prodotto,
- se i risultati fossero stati molto favorevoli per cariche tutto sommato "rilevanti", il margine di sicurezza dell'OSA sarebbero stati ancora più garantiti.

Nell'impostare il *challenge test* si è anche tenuto presente un dato di fatto importante: il batterio può inquinare un alimento trovandosi in uno di due stadi di vita:

- uno stadio "vitale" (V) in cui il batterio non solo è vivo, ma è anche in fase di duplicazione più o meno attiva, se le caratteristiche del substrato lo consentono
- uno stadio "non vitale" (NV) nel quale il germe è vivo, ma non riesce a duplicare perché tutte le sue energie sono destinate a mantenerlo in vita, in attesa di condizioni più favorevoli.

In genere, quando arriva a inquinare una derrata alimentare *L. monocytogenes* si trova nella fase "non vitale" perché ha già subito in precedenza una o più condizioni disagiate che agiscono sul ceppo stressandolo e inducendolo a chiudersi in quella particolare fase vitale (gli anglosassoni parlano di VBNC *Viable But Not Culturable cell*).

Nello stadio "non vitale" il batterio diventa molto più resistente agli stress ambientali esterni di quanto non sia lo stesso ceppo in fase di crescita vitale. In altri termini, uno stesso valore di pH e/o di attività dell'acqua libera ( $a_w$ ) di un alimento possono frenare efficacemente la crescita del ceppo in fase V, ma non in quella NV e questo ha importanti ripercussioni sulla persistenza del batterio nell'alimento stesso e sulla sua pericolosità per l'uomo.

Si è pertanto stabilito di operare con uno stesso ceppo di *L. monocytogenes*, ma in due differenti condizioni ("vitale" e "non vitale").

Tenendo conto dei suddetti presupposti, si è quindi proceduto nel seguente modo:

- È stato preso in esame un ceppo di *Listeria monocytogenes* standard di riferimento (ATCC 13932 isolato da un caso clinico di listeriosi umana).



- Dal ceppo di *L. monocytogenes* di riferimento si sono ricavate due subculture. La prima è stata coltivata per 18 ore a 37°C prima dell'inoculazione (ceppo vitale V); la seconda è stata coltivata per 18 ore a 37°C e poi sottoposta a 72 ore di refrigerazione profonda, per indurla a chiudersi in uno stadio di "non vitalità" (ceppo NV).
- Ognuno dei due ceppi batterici è stato coltivato in modo da arrivare a ottenere, nella brodocoltura, una carica presuntiva di 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> ufc/ml.
- Al momento dell'inoculazione, le sospensioni batteriche iniziali sono state diluite in soluzione fisiologica tamponata sterile seguendo il criterio delle diluizioni decimali, per ottenere la carica microbica voluta nell'alimento:
  - da 1 a 10 ufc/g di prodotto (1<sup>a</sup> serie di campioni di insalata di mare, e tutti i campioni di tacchino in *salsa vinaigrette*)
  - da 10 a 100 ufc/g di prodotto (2<sup>a</sup> serie di campioni di insalata di mare).
- Le temperature di mantenimento dei campioni di alimenti in prova sono state decise tenendo in considerazione le normali condizioni di conservazione dei prodotti in esame, quindi temperature di refrigerazione, che in quanto tali, sempre inferiori o uguali a 4°C come indicato in etichetta. Sarebbe perciò stato sufficiente eseguire le prove esclusivamente mantenendo i campioni di alimento inoculati a 4°C, per modellare il comportamento del batterio nel substrato a quell'unica temperatura. In realtà si è preferito allestire tutte le prove in doppio e mantenere una serie di campioni anche a 8°C, in modo da simulare il comportamento del batterio anche in condizioni di abuso termico del prodotto.
- Per quanto riguarda le scadenze temporali delle analisi di controllo, esse sono state decise in base alla durabilità commerciale di ciascuno degli alimenti presi in considerazione per la prova (60 gg per il tacchino in salsa vinaigrette e 120 gg per l'insalata di mare); si sono perciò allestiti, in doppio, diverse serie di campioni uguali che sono stati analizzati a intervalli di tempo regolari.

Più precisamente:

- Per il tacchino in salsa vinaigrette le analisi di riscontro di crescita del batterio sono state effettuate al:
  - giorno 1 (quello successivo all'inoculazione)
  - 20° giorno di conservazione
  - 40° giorno di conservazione
  - 60° giorno di conservazione.
  
- Per l'insalata di mare le analisi sono state effettuate al:
  - giorno 1 (quello successivo all'inoculazione)
  - 25° giorno di conservazione
  - 70° giorno di conservazione
  - 120° giorno di conservazione.

### 3.1.2 ESECUZIONE DELLE PROVE

#### TACCHINO IN *SALSA VINAIGRETTE*



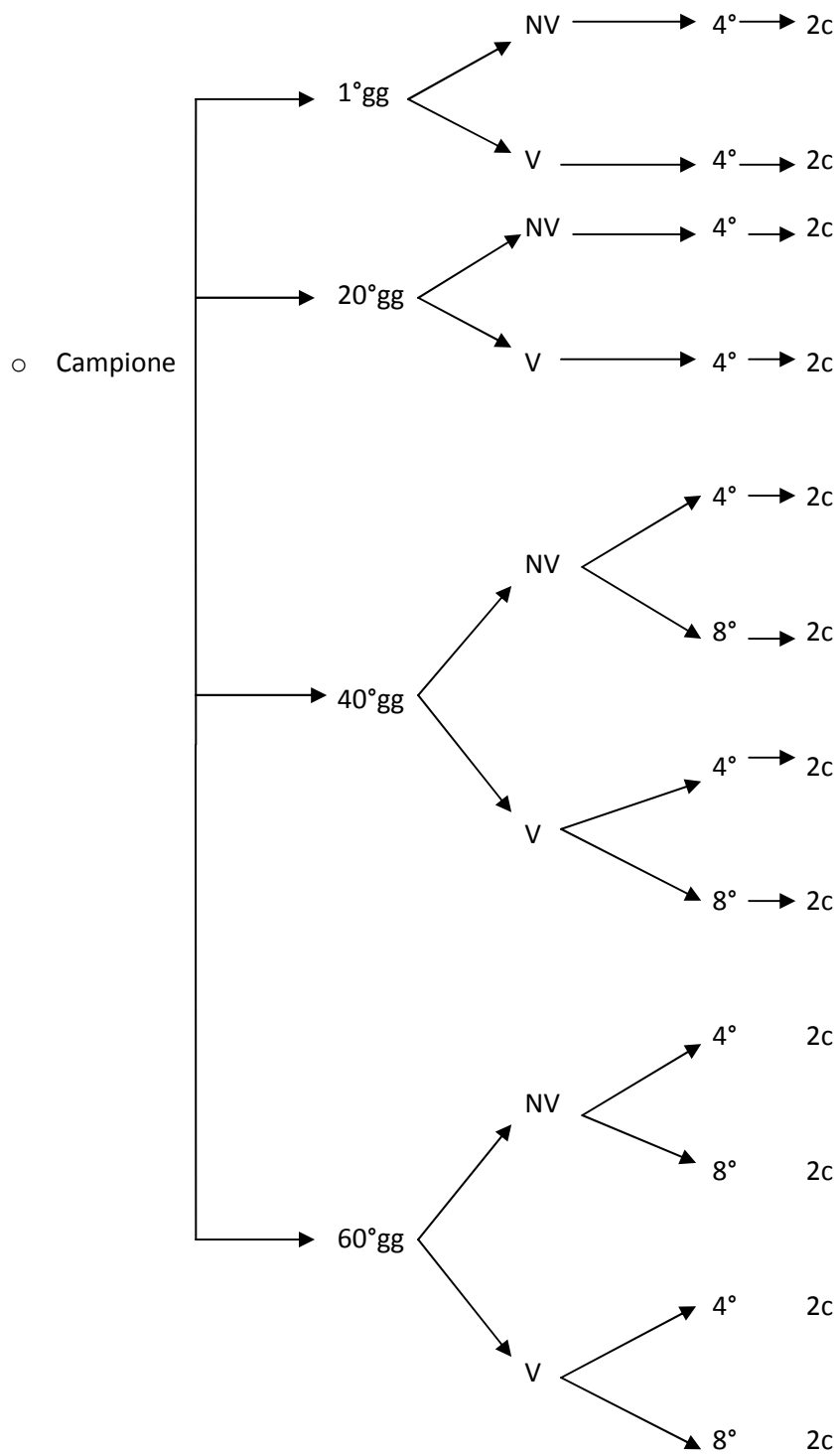
Le prove sul tacchino in salsa vinaigrette sono state condotte cercando di simulare il più possibile le condizioni di produzione e di conservazione del prodotto in commercio.

#### MATERIALI :

- tacchino
- *salsa vinaigrette*;
- affettatrice;
- vaschette in cui contenere il prodotto;
- macchina e Sacchetti per sottovuoto;
- soluzione contenente *Listeria monocytogenes*;
- pipette per inoculo della listeria.

Di seguito si riportano in dettaglio le singole fasi di suddette prove:

- PRIMA FASE: inizialmente è stato deciso il numero di campioni da preparare in base alle prove di nostro interesse; il numero è stato stabilito considerando in numero delle prove, i campioni inoculati coi ceppi vitali del batterio e quelli inoculati coi ceppi non vitali, le due diverse temperature di conservazione dei campioni e il fatto di voler fare tutti i campioni in doppio; stando al numero previsto dai suddetti ragionamenti in totale sono stati preparati 24 campioni di tacchino in salsa vinaigrette. Più schematicamente:




---

TOTALE 24 CAMPIONI

- SECONDA FASE: sulle sospensioni batteriche iniziali sono state effettuate le opportune diluizioni con soluzione fisiologica tamponata sterile seguendo il criterio delle diluizioni decimali, per ottenere la carica voluta nell'alimento; in questo caso da 1 a 10 ucf/g.
- TERZA FASE: successivamente si è proceduto con l'affettatura del tacchino (il numero era di 4 fette per campione quindi un totale di 96 fette di tacchino) e la sua disposizione nei contenitori di plastica; il tutto cercando di simulare il più possibile la struttura del prodotto in commercio (Foto 1, foto 2).



Fig. 1 In alto il prodotto in commercio, in basso i campioni da noi preparato.



Fig. 2 Particolare del campione da noi allestito

- QUARTA FASE: si è poi proseguito con la farcitura del tacchino con la salsa vinaigrette, anche in questo caso cercando di ottenere per quanto possibile la reale distribuzione nel prodotto in commercio (Foto 3).

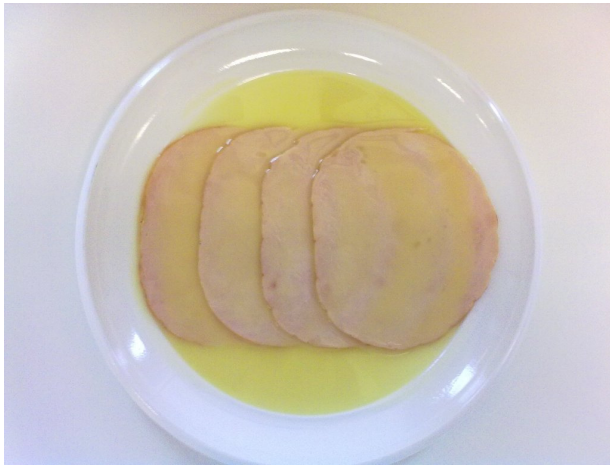


Fig. 3 Il tacchino con la salsa vinaigrette.

- QUINTA FASE: è seguito l'inoculo di 2ml di sospensione contenete *Listeria monocytogenes*, la fase più delicata, sia per l'attenzione, sempre necessaria, durante la manipolazione di ceppi batterici sia per la precisione nell'inoculo stesso, in quanto è stato necessario effettuare una disposizione uniforme della sospensione su tutta la superficie del prodotto nonostante l'esigua quantità della stessa (Foto 4, foto. 5,6).



Fig. 4 Quantità di sospensione contenente *Listeria monocytogenes* inoculata.

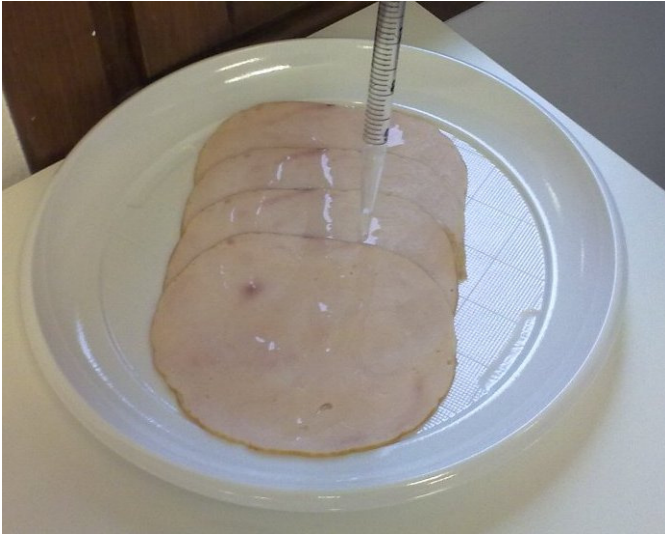


Fig. 5 Inoculo di *Listeria monocytogenes* nel prodotto.



Fig. 6 Inoculo di *Listeria monocytogenes* nel prodotto.

- SESTA FASE: I campioni così preparati sono stati messi sottovuoto e correttamente siglati. Sul sacchetto è stato riportato il ceppo inoculato (V vitale o NV non vitale) la temperatura a cui sarà poi tenuto il campione, la data di inoculo e i giorni delle rispettive analisi (Foto 7).

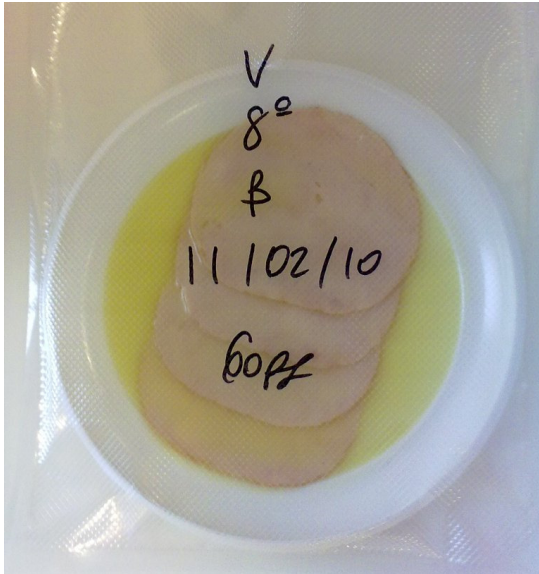


Fig. 7 Campione in busta per sottovuoto

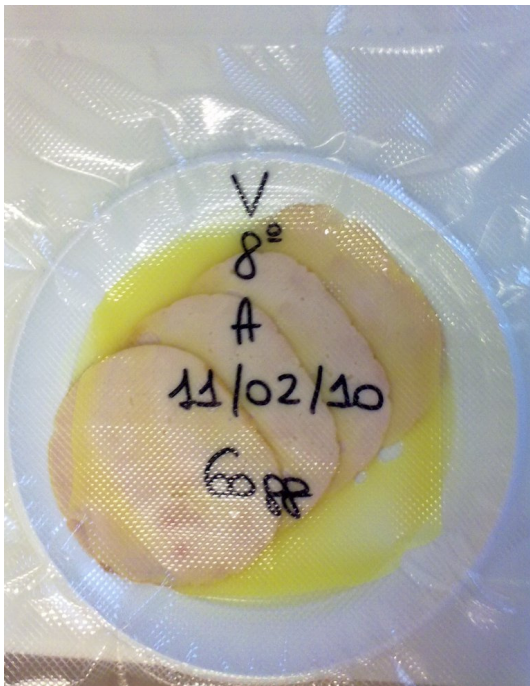


Fig. 8 Campione sottovuoto.

- SETTIMA FASE: ultimata la preparazione dei campioni questi sono stati riposti chi a 4° e chi 8°C nei rispettivi frigoriferi e qui conservati fino alle stabilite date di analisi.



- OTTAVA FASE: alle date stabilite, più precisamente il giorno successivo all'inoculo, 20, 40 e 60 giorni dopo sono stati prelevati i campioni dai frigoriferi ed eseguite le rispettive analisi quantitative, come di seguito descritto:

### **ANALISI QUANTITATIVE:**

#### MATERIALI:

- Cappa
- Bunsen
- piastre petri
- terreno selettivo ALOA (Agar Listeria acc. to Ottaviani & Agosti (ALOA) è un terreno selettivo e differenziale per la ricerca ed il conteggio di *Listeria monocytogenes* negli alimenti)
- terreno MRS (De Man, Rogosa e Sharpe Agar) è un terreno per il conteggio di *Lactobacillus spp*
- pipette e puntali sterili
- flaconi e provette di vetro per le diluizioni
- spatola
- termostato.

#### FASI (preparazione della soluzione madre):

- Inizialmente, sono state preparate le piastre Petri necessarie per effettuare le semine con terreno ALOA (specifico per *Listeria*) e MRS per *Lactobacillus spp.*; il processo definito come "semina" rappresenta la deposizione, tramite apposita pipetta, di 0,1ml di una soluzione più o meno diluita rispetto ad un'altra soluzione, detta "madre", che rappresenta il punto di partenza per ogni ricerca batterica di tipo quantitativo.

- Per ottenere la soluzione di partenza da analizzare, sono stati prelevati, nel modo meno contaminante possibile (facendo uso di strumenti sterili e lavorando in vicinanza del Bunsen) 20g esatti dal campione in esame messi successivamente all'interno di uno specifico sacchetto di plastica sterile; nello stesso sacchetto aggiunti poi 180ml di soluzione fisiologica sterile, per ottenere una diluizione di 1:10 o "alla -1", la cosiddetta "soluzione madre".
- A questo punto, ogni sacchetto è stato immesso all'interno di un specifico strumento, lo Stomacher, che ha la funzione di omogeneizzarne nel modo più accurato possibile il contenuto;

Dopo aver ottenuto la soluzione madre, è stato preparato il materiale (lavorando sotto cappa a flusso laminare d'aria) per ottenerne diverse diluizioni:

- diluizione 1:100 ("alla -2");
- diluizione 1:1000 ("alla -3");
- diluizione 1:10000 ("alla -4");

In boccettine contenenti 9ml di soluzione fisiologica sterile si è aggiunto, con apposita pipetta, 1ml della soluzione più concentrata in ordine esponenziale.

FASI (preparazione delle diluizioni):

- con un puntale sterile, si è prelevato con la pipetta 1ml dalla soluzione madre, spipettando leggermente al suo interno;
- che è stato poi immesso nella prima boccettina, siglata con la scritta "-2", trattandosi di una diluizione 1:100;
- dopo aver cambiato il puntale utilizzato con un altro sterile, è stato prelevato ancora 1ml, ma questa volta dalla stessa boccettina con diluizione 1:100, spipettando leggermente al suo interno;
- il tutto è stato poi immesso nella seconda boccettina, siglata con la scritta "-3", trattandosi di una diluizione 1:1000;
- continuando con questo procedimento, è possibile ottenere di conseguenza diluizioni anche molto spinte, rispetto alla soluzione "-1" di partenza, sempre ovviamente se lo si ritenesse necessario.

- A questo punto, per ogni campione sono state fatte più semine sulle diverse piastre Petri, siglate con le diverse diluizioni da eseguire per il campione.
- Il processo ha previsto due fasi:
- nella prima fase si è prelevato 0,1ml da una delle boccettine con le diverse diluizioni di un determinato campione, e posizionato al centro di un terreno sulla rispettiva piastra Petri, siglato per quella precisa diluizione e campione;
- nella seconda fase, la semina per spatolamento, con l'utilizzo di un'ansa di vetro che, dopo passaggio su fiamma viva del Bunsen, è stata utilizzata per distribuire al meglio e nel modo più omogeneo possibile la diluizione sul terreno.

Eseguito questo passaggio, tutti i singoli terreni con i rispettivi inoculi sono stati messi ad incubare nel rispettivo termostato a 37°C corrispondente all'*optimum* di crescita del microrganismo.

In seguito, trascorse le ore necessarie per lo sviluppo, (in questo caso 24h per *Listeria* e 48 per *Lactobacillus*), sono state prelevate le piastre Petri dal termostato e osservate le colonie cresciute nel terreno in esame, valutandone il numero.

Per entrambi i prodotti si è deciso inoltre di studiare anche la crescita nei rispettivi campioni dei Batteri lattici (LAB) un gruppo di microrganismi che può svolgere un ruolo protettivo contrastando lo sviluppo di microrganismi patogeni.

Nell'ultimo decennio si è definito un nuovo approccio alla stabilizzazione degli alimenti, chiamato bioprotezione, che si basa sull'antagonismo dimostrato da alcuni microrganismi nei confronti di altri; i LAB, infatti, sono spesso utilizzati come colture starter nei prodotti a base di carne fermentati, in quanto, oltre a determinare (insieme ad altre famiglie di batteri) il flavour del prodotto, hanno un importante effetto protettivo, che si riflette anche in un prolungamento della shelf life. La fermentazione dei carboidrati presenti nella materia prima determina un abbassamento del pH in seguito alla produzione di acido lattico che disturba l'omeostasi del microrganismo patogeno e quindi la sua sopravvivenza. Inoltre l'interferenza microbiologica dei batteri lattici può essere legata alla produzione di batteriocine, sostanze di natura proteica che svolgono un importante ruolo nel controllo di microrganismi indesiderati.

## INSALATA DI MARE



Così come le prove sul tacchino anche quelle sull'insalata di mare sono state condotte cercando di simulare il più possibile le condizioni di produzione e di conservazione del prodotto in commercio.

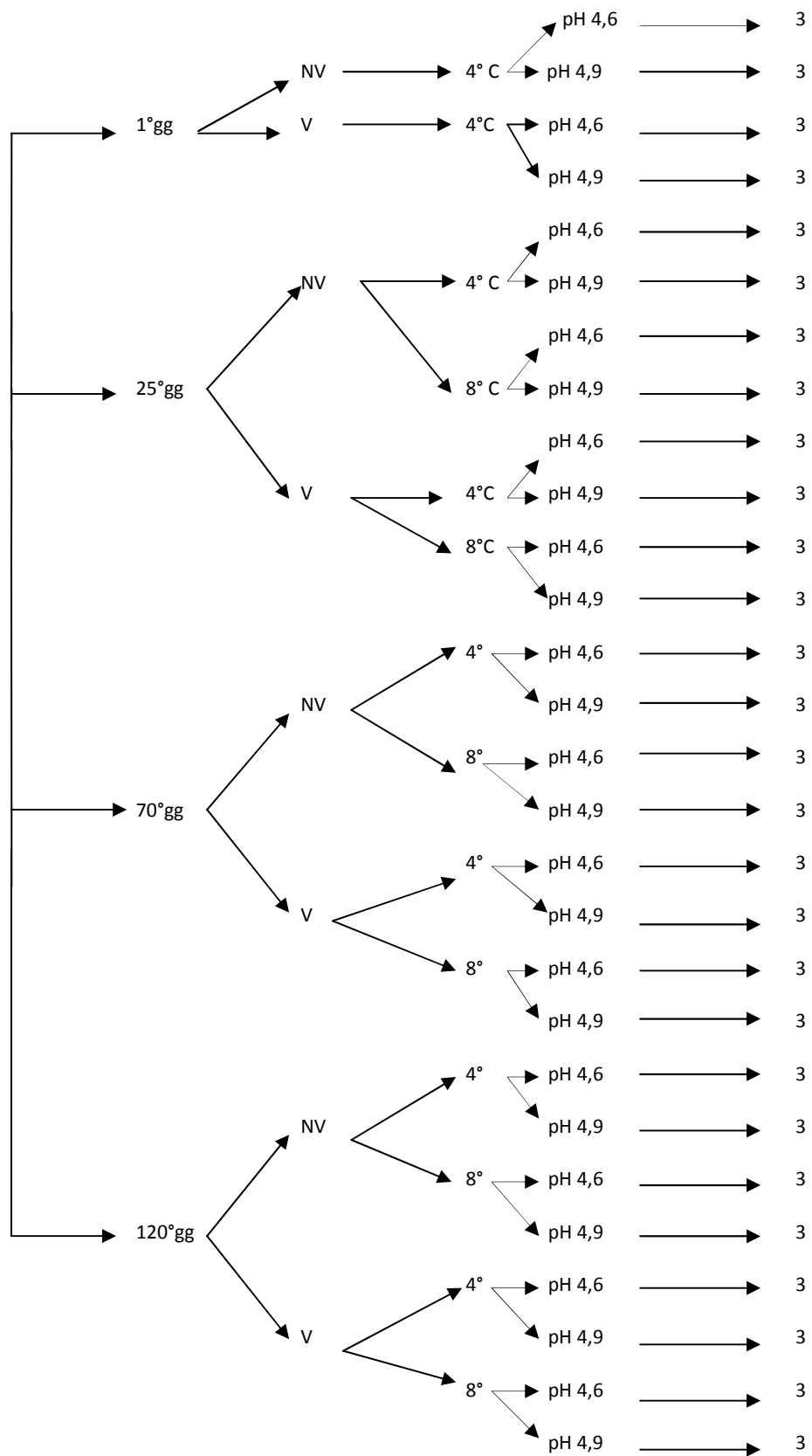
### MATERIALI :

- Insalata di mare
- Olio
- macchina e sacchetti per sottovuoto
- sospensione contenente *Listeria monocytogenes*
- pipette per inoculo della listeria.

Di seguito si riportano in dettaglio le singole fasi di suddette prove:

- PRIMA FASE: inizialmente è stato deciso il numero di campioni da preparare in base alle prove di nostro interesse; il numero è stato stabilito considerando in numero delle prove, i campioni inoculati coi ceppi Vitali del batterio e quelli inoculati coi ceppi non vitali, le due diverse temperature di conservazione dei campioni e il fatto di voler fare tutti i campioni in doppio; in più per questo prodotto si è scelto di studiare due diversi pH dello stesso, (4,6 e 4,9), per determinare se un leggero innalzamento del pH sia sufficiente a garantire ancora la salubrità del prodotto, perchè se così fosse si otterrebbe un prodotto meno acidificato, più apprezzato dal gusto dei consumatori, abbinato agli ulteriori fattori limitanti lo sviluppo di eventuali patogeni. Stando al numero previsto dai suddetti ragionamenti in totale sono stati preparati 84 campioni di tacchino in salsa vinaigrette. Più schematicamente:

○ Campione



TOTALE **84** CAMPIONI

- SECONDA FASE: sulle sospensioni batteriche iniziali sono state effettuate le opportune diluizioni con soluzione fisiologica tamponata sterile seguendo il criterio delle diluizioni decimali, per ottenere la carica voluta nell'alimento; in questo caso da 1 a 10 ucf/g.
- TERZA FASE: sono stati pesati 100g di insalata di mare e inseriti in sacchetti per il vuoto già preventivamente siglati.

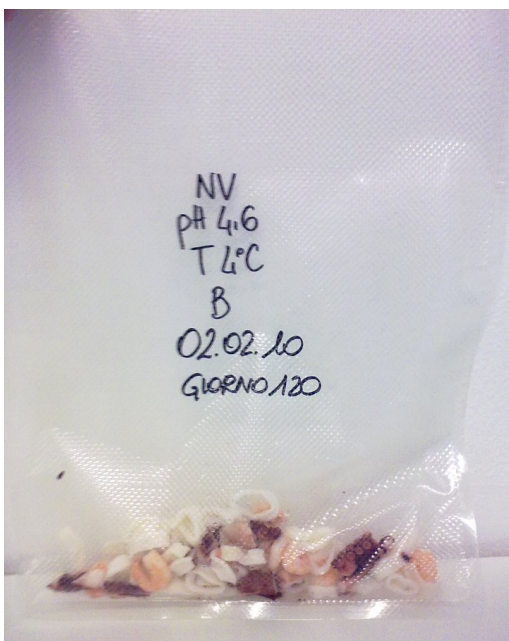


Fig 9. Insalata di mare in sacchetto per il vuoto.

- QUARTA FASE: negli stessi sacchetti sono stati inseriti 100ml di olio, così come presentato in commercio.



Fig 10. Insalata di mare con olio.

- QUINTA FASE: i campioni sono stati messi sottovuoto.

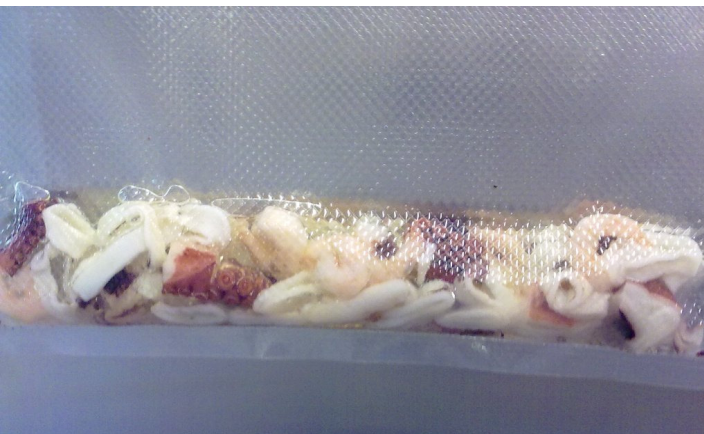


Fig 11. Insalata di mare sottovuoto.

- SESTA FASE: ultimata la preparazione dei campioni questi sono stati riposti chi a 4° e chi 8°C nei rispettivi frigoriferi e qui conservati fino alle stabilite date di analisi.
- SETTIMA FASE: alle date stabilite, più precisamente il giorno successivo all'inoculo, 25, 70 e 120 giorni dopo sono stati prelevati i campioni dai frigoriferi e analizzati come è stato fatto per il tacchino in salsa vinaigrette (vedi analisi quantitative del tacchino in salsa vinaigrette).





## 4. RISULTATI

### 4.1 TACCHINO IN SALSA VINAIGRETTE

In seguito all'esecuzione di tutte le suddette prove, di seguito si riportano i risultati nella tabella n° 13 sono riportate le cariche di *Listeria* nei singoli campioni ai vari tempi di analisi e alle diverse temperature.

**TABELLA 13.**

			4°C		8°C	
			A	B	A	B
TACCHINO IN VINAIGRETTE	TEMPO: 1	NV	30	10	\	\
		V	30	60	\	\
	TEMPO: 20	NV	<10	<10	\	\
		V	30	60	\	\
	TEMPO: 40	NV	<10	<10	10	<10
		V	10	<10	<10	<10
	TEMPO: 60	NV	10	<10	10	<10
		V	<10	<10	<10	<10

Per semplicità di seguito si riportano i grafici riferiti ai campioni A e B presi singolarmente e successivamente in un grafico comune.

Grafico n° 1 Campione A

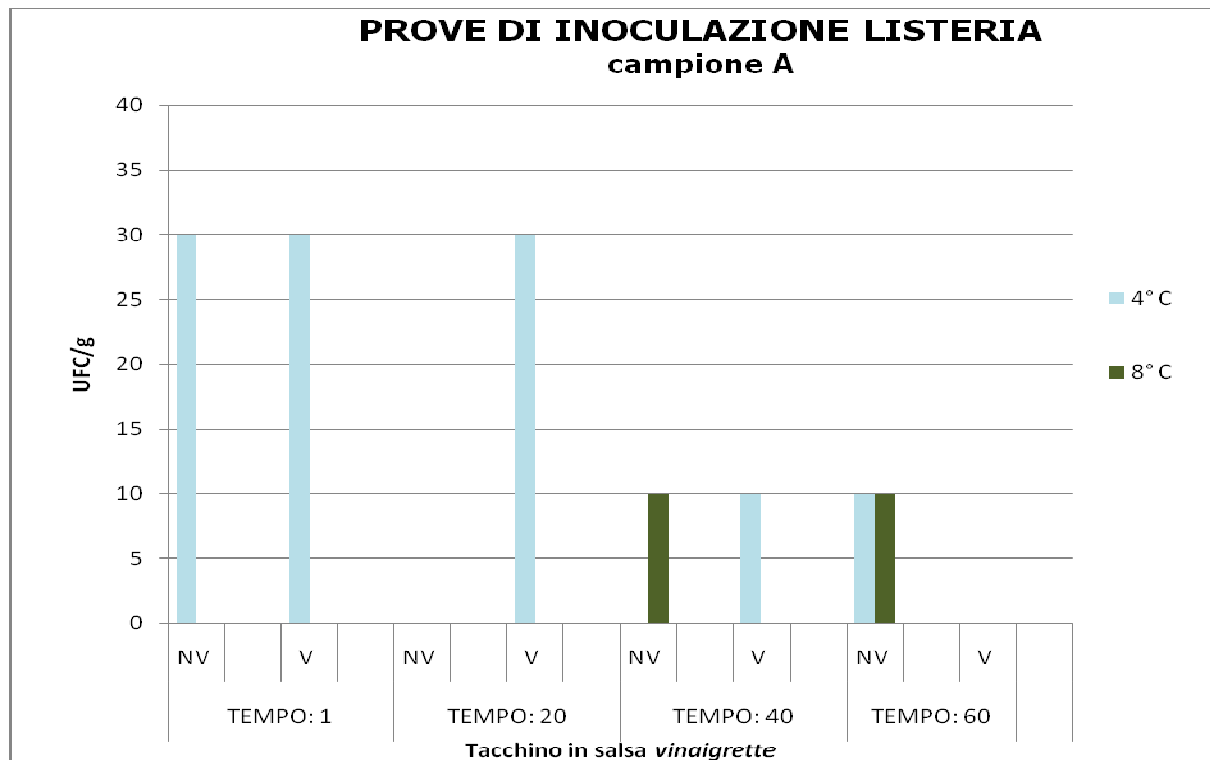


Grafico n° 2 Campione B

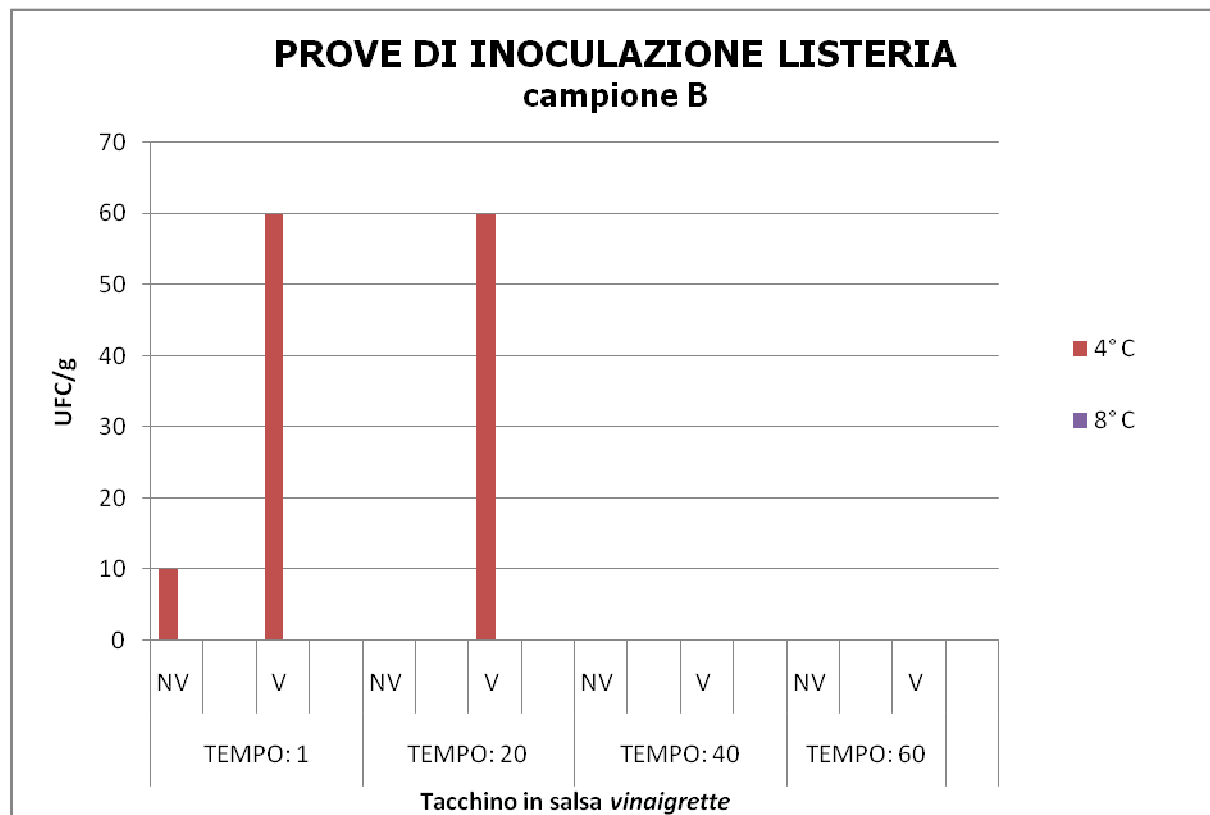
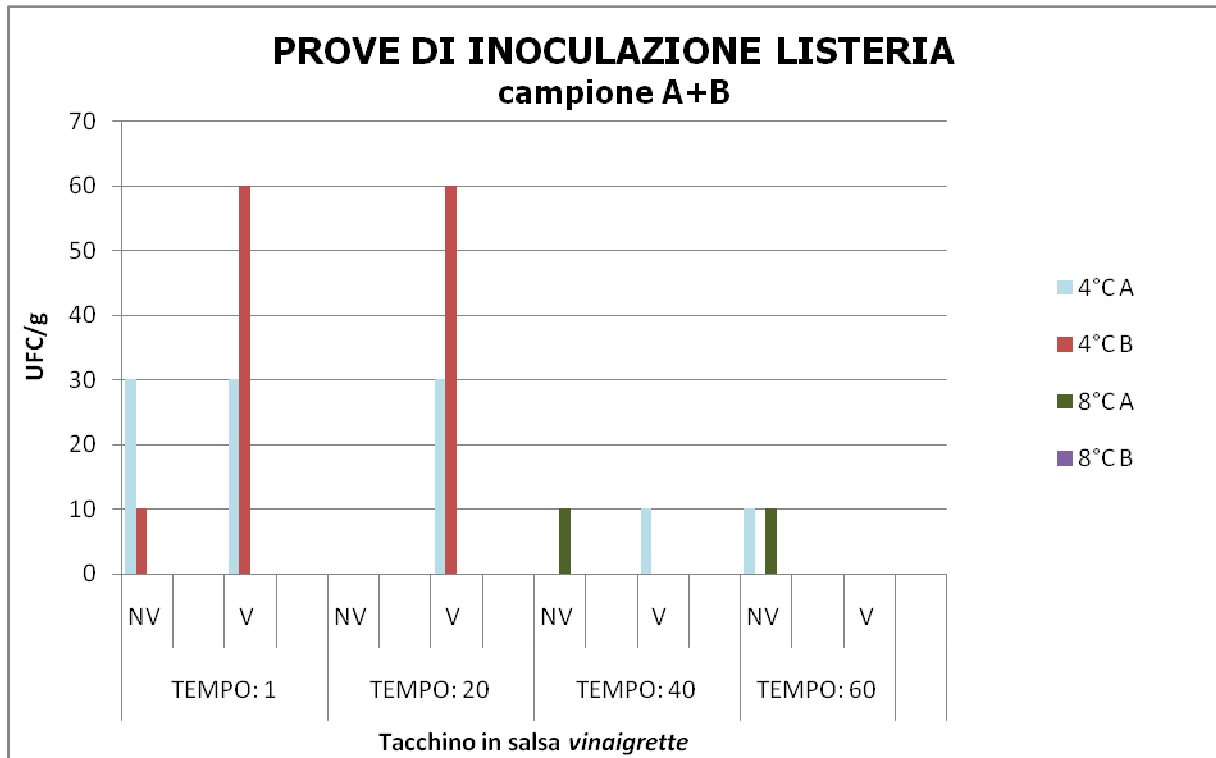


Grafico n° 3 Campioni A+B



Dai grafici si evince che le cariche inoculate si sono attestate, al giorno 1, per i ceppi non vitali, tra 10 e 30 Ufc/g, per i ceppi vitali, tra i 30 e i 60 ufc/g di prodotto; al giorno 20 i non vitali presentano cariche < 10 Ufc/g mentre per i vitali ho una stasi di crescita agli stessi livelli della precedente analisi, ovvero 30 e 60 Ufc/g. Dopo i 40 giorni si rileva una sostanziale riduzione della carica microbica specifica a valori pari o < a 10 ufc/g di prodotto tali per cui si può ammettere che il tacchino in salsa vinaigrette non è un substrato idoneo a favorire la crescita di *Listeria monocytogenes* anche in condizioni di abuso termico (8°C).

Nella tabella n° 14 sono riportati il pH rilevato in ogni singolo campione e la carica dei batteri lattici riscontrata.

**TABELLA 14.**

			4°C		8°C	
			pH	LAB	pH	LAB
TACCHINO IN VINAIGRETTE	TEMPO: 1	NV	4,94	1x10 <sup>6</sup>	\	\
		V	4,96	0,95x10 <sup>6</sup>	\	\
	TEMPO: 20	NV	4,41	13x10 <sup>6</sup>	\	\
		V	4,51	10x10 <sup>6</sup>	\	\
	TEMPO: 40	NV	4,23	16x10 <sup>7</sup>	4,26	10x10 <sup>7</sup>
		V	4,22	51x10 <sup>7</sup>	4,24	5x10 <sup>7</sup>
	TEMPO: 60	NV	4,27	12x10 <sup>6</sup>	4,23	15x10 <sup>6</sup>
		V	4,27	21x10 <sup>6</sup>	4,20	7x10 <sup>6</sup>

Grafico n° 4 Ph rilevati in campioni mantenuti a 4 e 8°C.

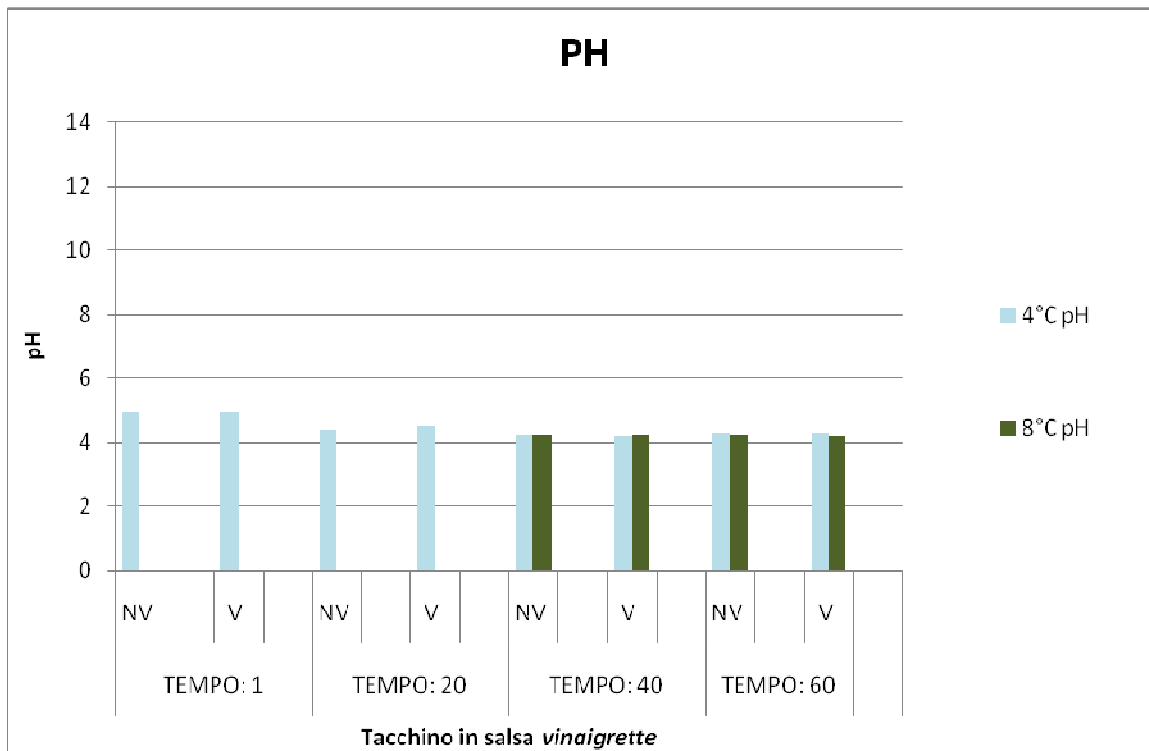


Grafico n° 5. Carica di batteri lattici nei vari campioni.

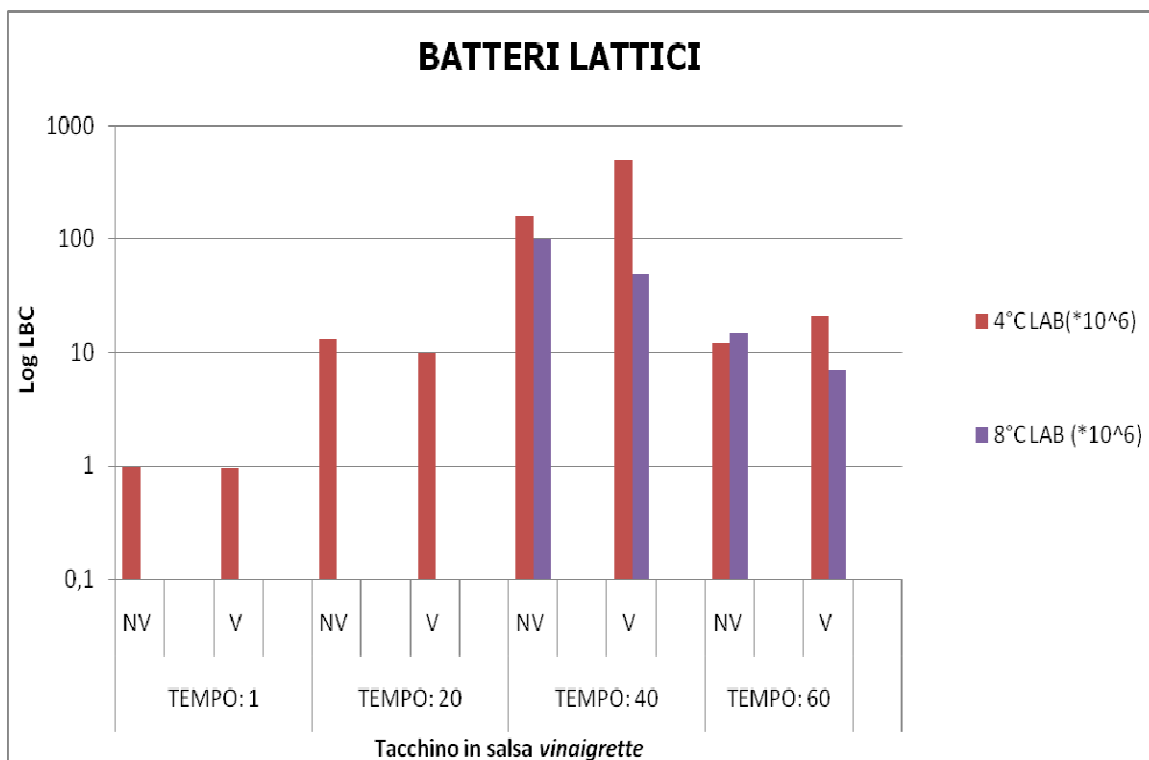
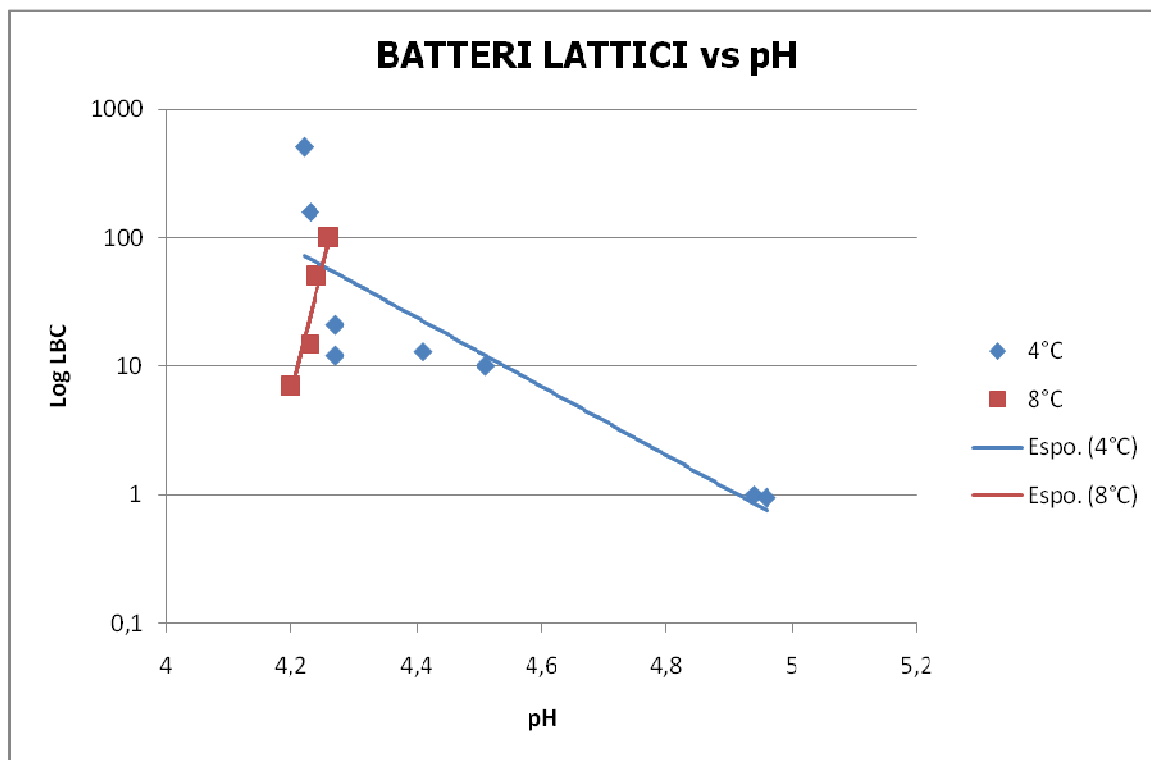


Grafico n° 6. Batteri lattici e pH.



Dalla tabella n° 14, riportante la crescita dei batteri lattici e l'andamento del pH del prodotto, e dai relativi grafici si nota come il pH scenda consecutivamente da valori iniziali di 4,94 al giorno 1, fino a valori di 4,2, al giorno 60; considerando la carica dei LAB si nota come questa aumenti, si passa infatti da una carica iniziale di  $1 \times 10^6$  a  $21 \times 10^6$  nel campione conservato a 4°C per 60 giorni e  $15 \times 10^6$  nel campione conservato in condizioni di abuso termico per 60 giorni. Comparando i valori di pH e di carica dei batteri lattici si evince come il pH scenda in relazione alla crescita dei lattici in seguito alle fermentazioni attuate dagli stessi, contribuendo ad inibire a loro volta la crescita di altri batteri, anche patogeni, quale *Listeria monocytogenes*.

## 4.2 INSALATA DI MARE

In seguito all'esecuzione delle prove sull'insalata di mare, di seguito si riportano i risultati nella tabella n° 15 sono riportate le cariche di *Listeria* nei singoli campioni ai vari tempi di analisi e alle diverse temperature e pH.

**TABELLA 15.**

			4°C						8°C						
			A		B		C		A		B		C		
			pH 4,6	pH 4,9	pH 4,6	pH 4,9	pH 4,6	pH 4,9	pH 4,6	pH 4,9	pH 4,6	pH 4,9	pH 4,6	pH 4,9	
INSALATA DI MARE	T: 1	NV 1-10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	\	\	\	\	\	\	
		V 1-10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	\	\	\	\	\	\
	T: 25	NV 1-10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
		V 1-10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	T: 70	NV 1-10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
		V 1-10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
	T: 120	NV 1-10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
		V 1-10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

Come si evince dalla tabella riportata, le cariche rilevate già dal primo giorno di analisi sono risultate esigue, le cariche infatti si sono dimostrate essere inferiori a 10 Ufc/g per tutti i campioni analizzati in tutte le prove effettuate. Ciò vale per i due regimi di conservazione, quello a normale temperatura di refrigerazione e quella a condizioni di abuso termico; anche per i campioni a differente pH, la diversa acidità non sembra far ottenere risultati diversi.

Da ciò si evince che nemmeno l'insalata di mare costituisce un terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes* e che, anche con un pH leggermente più elevato, la crescita del patogeno sia comunque controllata, garantendo però una minor acidità del prodotto e perciò un miglioramento delle sue proprietà organolettiche.

Dei suddetti campioni sono state eseguite, come per il tacchino, anche le analisi sul pH e sulla crescita dei batteri lattici, i risultati sono riportati nella tabella n° 16.

**TABELLA 16.**

			4°C				8°C			
			pH 4,6	pH 4,9	BL 4,6	BL 4,9	pH 4,6	pH 4,9	BL 4,6	BL 4,9
INSALATA DI MARE	T: 0	NV	4,43	4,67	< 10	< 10	/	/	/	/
		V	/	/	/	/	/	/	/	/
	T: 1	NV	4,15	4,65	< 10	20	/	/	/	/
		V	4,37	4,47	< 10	< 10	/	/	/	/
	T: 25	NV	4,3	4,64	< 10	< 10	4,28	4,52	< 10	< 10
		V	4,26	4,58	< 10	< 10	4,35	4,53	< 10	< 10
	T: 70	NV	4,19	4,48	<10	1600	4,25	4,5	<10	<10
		V	4,21	4,45	<10	<10	4,25	4,47	<10	16000
	T: 120 (*)	NV	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		V	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

(\*) n.d. valori non determinati in quanto si trattava di valori riferibili al prodotto che aveva già superato il termine minimo di conservazione.



Di seguito si riportano distintamente i grafici relativi ai pH rilevati nei campioni mantenuti a 4°C e a 8°C.

Grafico n° 7 Ph rilevati in campioni mantenuti a 4°C.

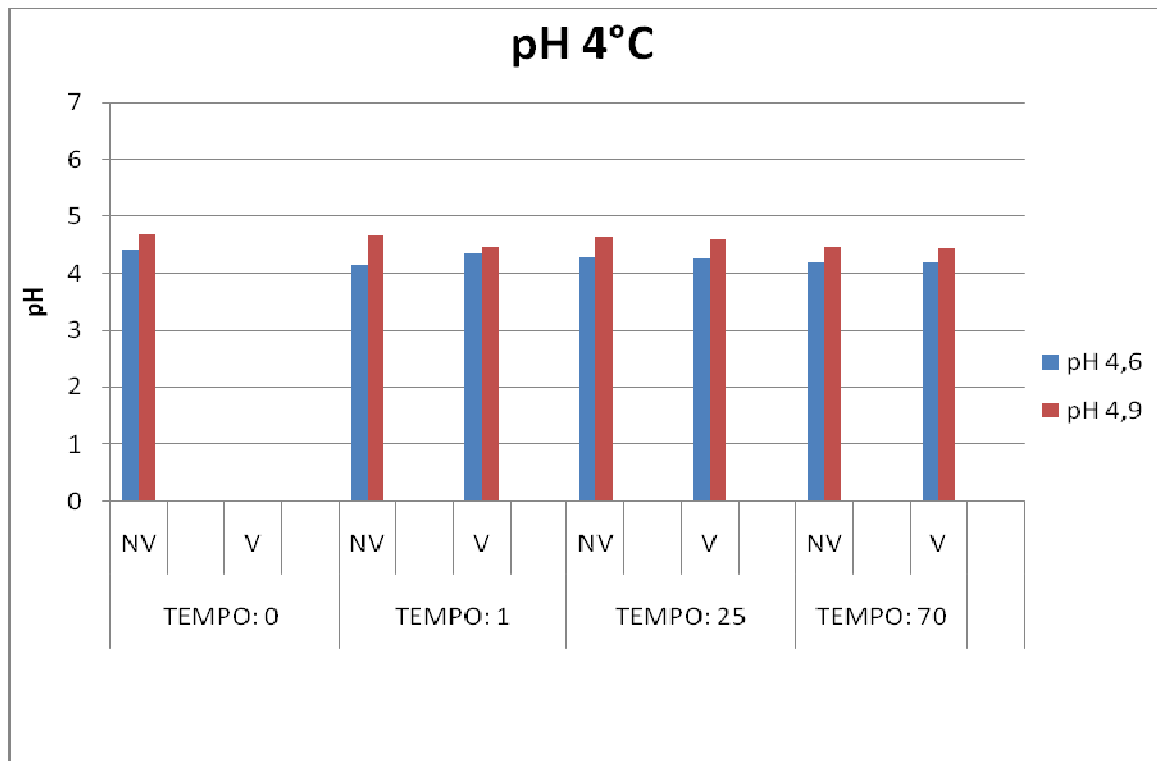
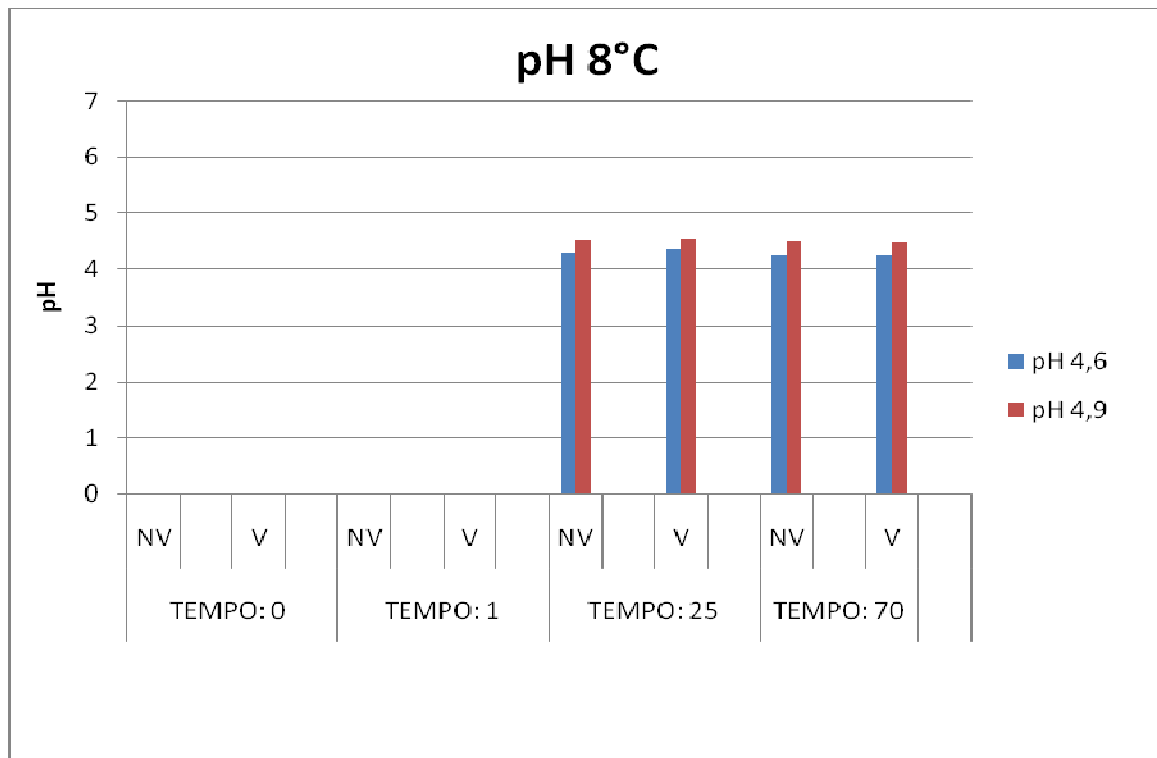


Grafico n° 8 pH rilevati in campioni mantenuti in condizioni di abuso termico.



Nelle successive grafici è riportata la carica dei batteri lattici rilevata nei singoli campioni alle due diverse temperature e ai due diversi pH.

Grafico n° 9 Carica totale di LAB in campioni mantenuti a 4°C.

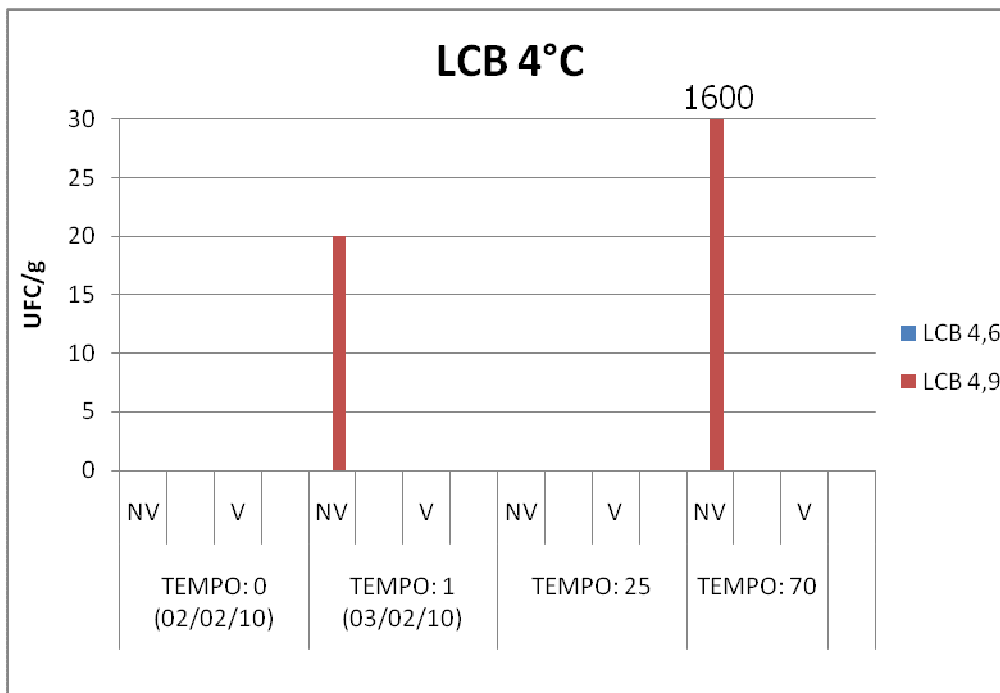
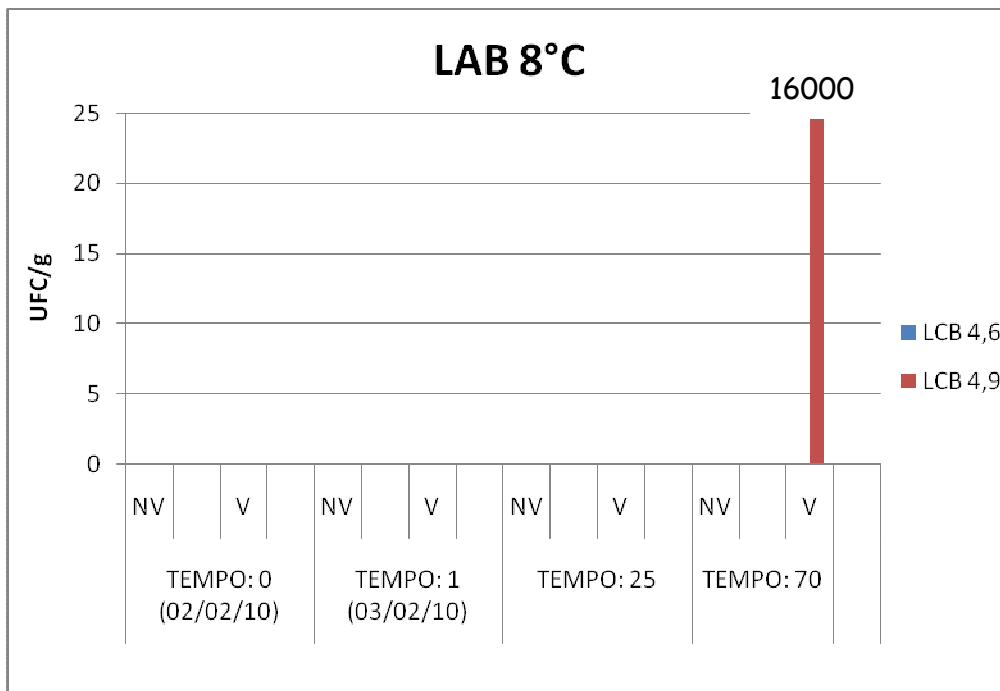


Grafico n° 10 Carica totale di LAB in campioni mantenuti in condizioni di abuso termico.



Dai grafici si nota come per tutti i campioni i valori di pH nelle diverse analisi non discostino molto tra loro, rimanendo per lo più costanti e comunque sempre inferiori a pH 4,5, un valore tale da garantire un certo grado di inibizione della crescita microbica. Si ricorda infatti che in particolare, nel caso di prodotto marinato quale l'insalata di mare, la garanzia sanitaria viene data dal basso valore di pH, inferiore a 4,5 e dalla temperatura di conservazione, inferiore a 4°C, valori che abbinati, sono universalmente considerati sicuri verso lo sviluppo di eventuale flora batterica patogena (ICMSF, 1996).

Per quanto riguarda la crescita dei batteri lattici la loro carica rimane alquanto bassa fin dalle prime analisi, già dalle analisi a T0 le cariche si presentano < 10 Ufc /g e si mantengono tali, se non per soli 3 campioni, più precisamente:

- campione T1, NV, pH 4,9 la cui carica si è rivelata essere di 20 Ufc/g;
- campione T70, NV, pH 4,9 la cui carica si è rivelata di 1600 Ufc/g;
- campione T70, V, pH 4,9 la cui carica è risultata di 16000 Ufc/g.

Dai suddetti valori si evince che, i batteri lattici non risultano essere in grado di raggiungere cariche significative nel tempo preso in considerazione durante le analisi nonostante si ritenga che nel caso delle insalate di mare marinate, la presenza di una costante flora lattica può a ragione essere considerata un importante fattore che sia da ostacolo allo sviluppo di patogeni, in particolare verso *Listeria monocytogenes*, patogeno psicrotrofo notoriamente spesso presente durante le fasi di lavorazione di prodotti ittici (Arcangeli *et al.*, 2003), nonché nei frigoriferi casalinghi (Beumer *et al.*, 1996).



## 5. CONCLUSIONI

Le prove sperimentali messe a punto e sviluppate nella mia tesi sono uno dei primi esempi di *challenge test* applicato in preparati di gastronomia.

Tali prove hanno permesso di accertare che

- (1) i due prodotti saggiati hanno caratteristiche di composizione e processo tali da non consentire la proliferazione di *Listeria monocytogenes* nel corso della conservazione valutata.
- (2) di conseguenza i due prodotti testati si possono ascrivere, con fondatezza scientifica, agli alimenti pronti di cui al punto 1.3 del Reg 2073/2005, relativo agli alimenti pronti "che non consentono la crescita di *Listeria monocytogenes*" e che ai suddetti prodotti si applichi, quindi, il criterio di *L. monocytogenes* fino a 100 ufc/g a fine vita commerciale del prodotto.

Un'ulteriore considerazione riguarda il *challenge test* stesso.

Nell'impostare un valido *challenge test* non ci si può esimere dal tenere in considerazione vari aspetti di ecologia microbica che riguardano, in particolare, il rapporto che si può instaurare tra *L. monocytogenes* e la matrice alimentare nella quale il batterio dovrà essere inoculato. Ciò implica una conoscenza approfondita delle caratteristiche dell'alimento in esame e le modalità di produzione e conservazione dello stesso. Ed è soltanto conoscendo al meglio le suddette caratteristiche che si potrà prevedere con buon margine di precisione il comportamento delle flore microbiche presenti al suo interno o sulla sua superficie, sia quelle utili, sia quelle alteranti, sia, infine, quelle più pericolose per la salute umana perché patogene.

Un'ulteriore difficoltà sta nel simulare il più possibile quanto verosimilmente avviene nella realtà, quando cellule di *L. monocytogenes* arrivano ad inquinare un prodotto alimentare.

Ho potuto verificare e provare di persona che è particolarmente difficile impostare e poi mettere in atto un valido *challenge test*, non solo per gli aspetti concettuali che esso presuppone, ma anche per la sua esecuzione pratica, che pone al personale arruolato una serie di problemi da risolvere.



## 6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Gazzetta ufficiale dell'Unione europea. Regolamento (CE) N. 852/2004 del parlamento europeo e del consiglio del 29 aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari.
- Gazzetta ufficiale dell'Unione europea. Regolamento (CE) N. 2073/05 della commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
- Pearson L.J., Marth E.H., 1990. *Listeria monocytogenes – Threat to safe Food Supply: A review*. Journal of dairy Scienze, Vol. 73 (4), pp. 912-928.
- Bartholomew M.J., Vose D.J., Tollefson L.R., Travis C.C. (2005) "A linear model for managing the risk of antimicrobial resistance originating in food animals". Risk Analysis, 25, 99-107.
- Borucki M.K., Peppin J.D., White D., Loge F., Call D.R. (2003) "Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*". Appl. Environm. Microbiol., 69,7336-7342.
- Faleiro M.L., Andrew P.W., Power D. (2003) "Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods". Int. J. Food Microbiol., 84, 207-216.
- Francois K., Valero A., Geeraerd A.H., Van Impe J.F., Debevere J., Gardia-Gimeno R.M., Zurera G., Devlieghere F. (2007) "Effect of preincubation temperature and pH on the individual cell lag phase of *Listeria monocytogenes* cultured at refrigeration temperatures". Food Microbiol., 24, 32-43.
- Gandhi M., Chikindas M.L. (2007) "*Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive". Int. J. Food Microbiol., 113, 1-15.

- Girardin H., Morris C.E., Albagnac C., Dreux N., Glaux C., Nguyen-The C. (2005) "*Behavior of the pathogen surrogates Listeria innocua and Clostridium sporogenes during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments*". FEMS Microbiol. Ecol., 54, 287-295.
  
- Hof H. (2003) "*History and epidemiology of listeriosis*". FEMS Immunology and Microbiology, 35, 199-202.
  
- Hwang C.-A., Marmer B.S. (2007) "*Growth of Listeria monocytogenes in egg salad and pasta salad formulated with mayonnaise of various pH and stored at refrigerated and abused temperatures*". Food Microbiol., 24, 211-218.
  
- Koutsoumanis K., Sofos J.N. (2005) "*Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of Listeria monocytogenes*". Int. J. Food Microbiol., 104, 83-91.
  
- McLauchlin J., Mitchell R.T., Smerdon W.J., Jewell K. (2004) "*Listeria monocytogenes and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods*". Int. J. Food Microbiol., 92, 15-33.
  
- Nicholson F.A., Groves S.J., Chambers B.J. (2005) "*Pathogen survival during livestock manure storage and following land application*". Bioresour. Technol., 96, 135-143.
  
- O'Driscoll B., Gahan C.G., Hill C. (1996) "*Adaptive acid tolerance response in Listeria monocytogenes: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrated increased virulence*". Appl. Environm. Microbiol., 62, 1693-1698.
  
- Scott V.N., Swanson K.M.J., Freier T.A., Pruet P. Jr., Svelim V.H., Hall P.A., Smoot L.A., Brown D.G. (2005) "*Guidelines for conducting Listeria monocytogenes challeng testing of foods*". Food Protection Trends, 25, 818-825.



- *"Guidelines for conducting Listeria monocytogenes challenge testing of foods"*  
Food Protection Trends, vol. 15 pages 818 – 825 (2005).
- *"Prevalence and growth of Listeria monocytogenes in naturally contaminated seafood"*  
Lasse Vigel Jørgensen and Hans Henrik Huss Danish Institute for Fisheries Research, Department of Seafood Research, Technical University of Denmark, Building 221, DK-2800 Lyngby, Denmark.
- *"Meningoencefalite da Listeria Monocytogenes: due casi pediatrici"*. E.Barth, I.Bruno, B.Longo, P.Petaros, M.Busetti, G.A.Zanazzo, M.Rabusin,P.Tamaro.
- *"InternalinA can mediate phagocytosis of Listeria monocytogenes by mouse macrophage cell lines"*. Richard T. Sawyerı Douglas A. Drevetsı Priscilla A. CampbellU\*tti and Terry A. Potter.
- *"Identification and characterization of new Listeria monocytogenes virulence factors. Surface and secreted proteins"*. H. Bierne, S. Bruck, N. Personnic, E. Gouin, D. Balestrino, O. Dussurget, L. Dortet.
- *"Guidelines for conducting Listeria monocytogenes challenge testing of foods"*- Food Protection Trends, vol. 15 pages 818 – 825 (2005).
- *"Ecologia microbica di un prodotto ittico Repfed (refrigerated processed foods of extended durability) e prove di challenge con Listeria monocytogenes"*. Ferrati M. , Corrain C. , Arcangeli G. , Lombardi A. , Andrighetto C.

## WEBGRAFIA

[http://www.analisisensoriale.it/sito/images/stories/cibipronti\\_mag2008.pdf](http://www.analisisensoriale.it/sito/images/stories/cibipronti_mag2008.pdf)

(ultima consultazione 05/05/2010)

[http://www.quartagamma.info/index.php?option=com\\_content&view=article&id=58](http://www.quartagamma.info/index.php?option=com_content&view=article&id=58)

(ultima consultazione 05/05/2010)

<http://www.ilprogressoveterinario.it/rivista/07n08/04.html>

(ultima consultazione 30/04/2010)

<http://pmp.arserrc.gov/PMPOnline.aspx>

(ultima consultazione 28/04/2010)

[http://www.izslt.it/izs/modules/sections/sito/IZS/formazione/documentazione/pres\\_microbiologia\\_challenge-test.pdf](http://www.izslt.it/izs/modules/sections/sito/IZS/formazione/documentazione/pres_microbiologia_challenge-test.pdf)

(ultima consultazione 06/05/2010)

<http://www.sicurezzadeglialimenti.it/listeria.htm>

(ultima consultazione 30/04/2010)

<http://www.epicentro.iss.it/problemi/listeria/listeria.asp>

(ultima consultazione 12/05/2010)

<http://www.antropozoonosi.it/malattie/tossinfezioni/tossinfezioni.php>

(ultima consultazione 12/05/2010)

<http://www.regione.veneto.it/NR/rdonlyres/A3C276C6-BBBD-469B-9EE6-F544929E8A03/0/listeriosi.pdf>

(ultima consultazione 12/05/2010)

<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-000029-03n/research/scientific-departments/cell-biology-and-infection/units-and-groups/bacteria-cell-interactions/research>

(ultima consultazione 12/05/2010)

[http://www.who.int/topics/listeria\\_infections/en/](http://www.who.int/topics/listeria_infections/en/)

(ultima consultazione 12/05/2010)

[http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm)

(ultima consultazione 08/05/2010)

<http://www.eurosurveillance.org/>

(ultima consultazione 12/05/2010)

<http://www.pulsenet-europe.org/>

(ultima consultazione 20/05/2010)

<http://www.medvetnet.org/cms/>

(ultima consultazione 22/05/2010)

[http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra\\_listeria/en/index.html](http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra_listeria/en/index.html)

(ultima consultazione 12/05/2010)



## RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento particolare al Professor Valerio Giaccone per la disponibilità e per il prezioso aiuto nella stesura di questo lavoro.

Ai miei genitori, per avermi sempre sostenuto e assecondato in ogni mia decisione, siete il mio punto di riferimento più grande ed è grazie a voi se ho avuto la possibilità di raggiungere questo obiettivo.

A Luca, un grazie di cuore per avermi sostenuta e sopportata in quest'ultimo periodo, impegnativo per entrambi, sei un sostegno fondamentale e ti sono immensamente grata per tutto quello che hai fatto e fai per me.

Agli amici che con me han condiviso quest'esperienza universitaria, in particolare alla Betty e alla Sara, avete contribuito a rendere questi anni indimenticabili.

A tutti i miei coinquilini e amici con cui ho vissuto in questi anni, in particolare al Tiziano e al Pola, per l'amicizia che sempre mi dimostrate.

A tutti i miei amici carnici Sarah, Elisa, Cuti, Gerry, Paisà, Fabietto e company grazie per il vostro sostegno, che, se pur spesso a distanza, è stato fondamentale.