

INDICE

Capitolo I: INTRODUZIONE

1. PREMESSA	1 pag
2. ZONOSI	5 pag
3. TASSONOMIA E INQUADRAMENTO DEL GENERE <i>LISTERIA</i>	6 pag
3.1 <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Listeria</i> spp. e fattori intrinseci degli alimenti.	9 pag
3.2 Sierotipi di <i>Listeria monocytogenes</i> come possibile fattore di virulenza.	12 pag
3.3 <i>Listeria monocytogenes</i> e la salute umana.	15 pag
3.4 <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Listeria</i> spp. e alimenti.	21 pag
3.5 <i>Listeria monocytogenes</i> : sistemi di conservazione degli alimenti, antibiotici e disinfettanti.	25 pag
4. PATOGENESI DELLA LISTERIOSI	31 pag
4.1 La carica infettante di <i>Listeria monocytogenes</i> .	35 pag
4.2 Forme cliniche della listeriosi umana ed animale.	38 pag
4.3 L'uomo come portatore asintomatico di <i>Listeria monocytogenes</i> .	43 pag
5. RUOLO DEI BOVINI NELLA CATENA ALIMENTARE	
5.1 Portatori asintomatici a livello enterico.	45 pag
5.2 <i>Listeria monocytogenes</i> sulla cute dei bovini.	46 pag
6. NOZIONI DEL PACCHETTO IGIENE	47 pag

Capitolo II: MATERIALI E METODI

1. OBIETTIVO DELLA TESI	50 pag
2. TECNICHE ANALITICHE	
2.1 Metodiche di campionamento.	51 pag
2.2 Analisi microbiologiche.	52 pag
2.3. Biochimico.	60 pag
2.4 Antibiogramma.	62 pag

Capitolo III: RISULTATI

1. RISULTATI	
1. Risultati per la prevalenza di <i>Listeria monocytogenes</i> nel contenuto intestinale dei bovini regolarmente macellati.	66 pag
1.1 Grafici	68 pag
2. Risultati dell'antibiogramma	84 pag
2.1 Grafici	85 pag
2. CONCLUSIONI	102 pag
3. BIBLIOGRAFIA	105 pag

Capitolo I

INTRODUZIONE

1. PREMESSA

Nella listeriosi, gli alimenti che spesso sono causa d'infezione sono i cosiddetti "alimenti pronti al consumo" RTE (*Ready-To-Eat food*), seguiti dai prodotti a base di carne quali pat  e salumi non ben stagionati, prodotti lattiero-caseari a base di latte crudo non sufficientemente stagionati e maturati, prodotti della pesca trasformati (soprattutto salmone affumicato) e i vegetali della quarta gamma.

In Inghilterra e Galles tra il 1996 e il 2000 si sono registrati 221 casi di malattia, con 78 decessi; 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 e 9 morti in 9 stati diversi (ISS, 2002). Nell'Agosto 2008 in Canada si sono avuti 56 casi di listeriosi con 20 morti per consumo di prodotti carnei RTE crudi e cotti. In Danimarca nel 2009   stato pubblicato uno studio che evidenziava l'incremento notevole di listeriosi umana; infatti, nel 2009 sono stati registrati 97 casi di listeriosi rispetto i 57 del 2008. Lo studio ha dimostrato che l'incremento della listeriosi umana era dovuto al notevole aumento del consumo dei prodotti RTE, che nel 2003 era del 34% mentre nel 2009   passato all'87% (Kvistholm, 2009). Nel marzo 2010, in Austria ci sono stati 12 casi di listeriosi per il consumo di formaggio, di una ditta molto nota, con un bilancio di 5 morti, soprattutto persone oltre i 70 anni di et  (AGES: Agenzia Austriaca per la Sicurezza della Salute e la Nutrizione). Sempre nel 2010 un neonato   stato ricoverato in un ospedale del sud Vietnam con febbre,

stanchezza, anoressia e rash cutaneo; dall'esame del liquido cefalorachidiano è stata isolata *L. monocytogenes* (Mokta, 2010).

L. monocytogenes può moltiplicare e formare biofilm nelle industrie alimentari. I punti in cui il batterio può insediarsi possono fungere da serbatoio di diffusione verso altre superfici e verso gli stessi prodotti alimentari come i prodotti RTE (Tompkin, 2002).

Dagli ambienti di lavoro e dagli utensili sono state isolate una notevole varietà di ceppi di *L. monocytogenes*. Per esempio, Gray e collaboratori (2004) hanno isolato 502 ceppi di *L. monocytogenes* da circa 30000 prodotti RTE durante un'indagine che hanno condotto negli USA tra il 2000 e il 2001. A loro volta Lundén e coll. (2008) hanno isolato 367 ceppi di *L. monocytogenes* in utensili e alimenti di 3 impianti di produzione di carne durante un periodo di sei anni. Dalla bibliografia di quest'ultimo lavoro non emerge un dato fondamentale, ossia il numero totale dei campionamenti.

Tutti questi risultati dimostrano con certezza che gli alimenti RTE possono essere potenzialmente contaminati da differenti ceppi di *L. monocytogenes*.

L. monocytogenes è un batterio particolarmente diffuso nell'ambiente e inquina un enorme varietà di alimenti, di origine sia animale che vegetale. Una delle fonti di inquinamento per le carni destinate al consumo umano è il macello, ma in bibliografia si trovano pochissimi dati sulla prevalenza di *L. monocytogenes* tra gli animali macellati, rispetto all'enorme mole di dati su *Salmonella enterica*, *Campylobacter* e ceppi VTEC di *E. coli*. Questa ricerca valuta la prevalenza di portatori asintomatici di *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. nel contenuto intestinale fra i bovini regolarmente macellati nel Nord Italia.

I prodotti di origine animale sono stati parte integrante dell'alimentazione umana dalle prime fasi evolutive. Il consumo di prodotti animali, ha trovato ampia diffusione non solo per le loro elevate proprietà nutrizionali, ma anche perché questi sono in parte la naturale trasformazione dei prodotti vegetali scarsamente utilizzabili in modo diretto dall'uomo. Infatti, i poligastrici, grazie alle simbiosi con i microrganismi presenti nel rumine, consentono di ricavare da vegetali ricchi di carboidrati strutturali (cellulosa, emicellulose, pectine, ecc.) difficilmente digeribili dall'uomo, alimenti di elevato potere nutrizionale, quali il latte e la carne.

Dall'analisi dell'evoluzione dei consumi di carne bovina nell'ultimo cinquantennio, emerge che nel secondo dopoguerra il consumo di carne in Italia ha evidenziato un periodo di espansione, nel corso del quale la domanda ha avuto una curva di crescita accentuata, frutto dell'aumento delle disponibilità economiche della popolazione e del crescente valore alimentare attribuito al prodotto carne.

Inoltre, recenti dati Ismea-Nielsen (2001) rilevano che, in Italia, tra novembre 2000 e novembre 2001, come conseguenza della crisi da BSE, si è registrata una flessione marcata del consumo di carni. Più in generale, le cause che hanno indotto un calo del consumo di carne sono molteplici e non vanno esclusivamente ricercate nella sensazione da parte del consumatore di una mancanza di sicurezza sanitaria (BSE, influenze aviare, blue tongue ovina, diossina uova, ecc.).

Inoltre negli ultimi anni è avvenuto un cambiamento nelle abitudini alimentari, con sempre minor tempo da dedicare alla preparazione dei pasti e con la tendenza a consumare il pasto centrale della giornata fuori casa. Si sono affacciate quindi nuove esigenze, come quella di disporre di tagli di carne di facile e veloce preparazione e di prodotti

alternativi ai tradizionali, come prodotti fast food ed i trasformati (III e IV gamma).

Si è i passati nel giro di pochi anni da una scelta basata solo sull'aspetto quantitativo (prezzo) ad una che tiene conto degli aspetti igienico- sanitari ma anche nutrizionali, organolettici e reologici del prodotto.

In Italia rispetto ad altri Paesi europei, il consumo medio nazionale di carne è inferiore in quanto c'è una minore richiesta da parte del consumatore di carni suine, mentre i consumi di carni bovine e avicole appaiono simili.

In Italia, il consumo di carne bovina (espresso in peso carcassa) complessivo ammonta a circa 1,5 milioni di tonnellate di cui circa il 60% deriva da capi macellati nel nostro Paese mentre la restante quota viene importata da paesi terzi.

2. ZOONOSI

L'organizzazione mondiale della sanità definisce *zoonosi* ogni malattia o infezione naturalmente trasmissibile da animali vertebrati all'uomo. Gli animali stessi devono avere un ruolo essenziale per il mantenimento dell'infezione in natura.

Le *zoonosi* possono essere di origine batterica, come nel caso di *L. monocytogenes*, ma anche di origine virale, parassitaria nonché da agenti non convenzionali (prione della BSE).

Con il termine *sapronosi* si annoverano le malattie infettive che l'uomo contrae per contatto con veicoli inanimati, in cui però il microorganismo deve moltiplicare e non solo sopravvivere. Un esempio sono le intossicazioni da *Bacillus* e *Clostridium*.

Si definiscono malattie alimentari le forme cliniche che l'uomo contrae per assunzione e/o manipolazione di alimenti che contengono microrganismi patogeni, tossine (enterotossine, citotossine, neurotossine) prodotti del loro metabolismo (istamina, tiramina, altre amine biogene) o residui di composti chimici pericolosi (metalli pesanti, ecc.).

I microrganismi in grado di provocare *zoonosi* possono contagiare l'uomo per diverse vie: morsi o graffi; contatto con sangue e/o altri liquidi biologici (es. saliva, urine); la puntura di insetti (zecche, pulci) che trasportano i microrganismi dall'animale all'uomo; l'ingestione di alimenti e bevande (latte, uova, carni); il contatto con i liquami delle fosse biologiche e il letame degli animali infetti.

3. INQUADRAMENTO TASSONOMICO DEL GENERE

LISTERIA

Listeria monocytogenes fu isolata per la prima volta a Cambridge nel 1924 da Murray e coll. in conigli che morivano di una malattia allora sconosciuta e che causava una grave monocitosi. Per questo fu chiamata *Bacterium monocytogenes*. Nel 1940 Pirie diede al genere il nome *Listeria*, in onore del chirurgo inglese sir Joseph Lister. Nel 1983 in Canada Schlech e coll. hanno descritto il primo caso epidemico di listeriosi alimentare, provocato dal consumo di crauti acidi. Oggi i dati della bibliografia scientifica ci indicano che oltre il 95% dei casi di listeriosi umana sono di origine alimentare.

Il genere *Listeria* fa oggi parte della famiglia Listeriaceae insieme al genere *Brochothrix*. Conta sei specie: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi*.

Le listerie si presentano in forma di bacilli regolari (0,5 x 1,0 micron), ma sono stati descritti occasionalmente anche ceppi filamentosi che possono raggiungere i 100 micron di lunghezza. Sono batteri Gram positivi, mobili per flagelli peritrichi, non sporigeni, tendenzialmente anaerobi facoltativi e nettamente psicrotrofi: duplicano tra -1° e 50°C e in intervalli di pH compresi tra 4,0 e 9,5. Portati a temperature sempre più vicine a 0°C anche le listerie tendono a rallentare gli atti di duplicazione. Tra i batteri non sporigeni sono i più termoresistenti: occorrono almeno 15'' a 72°C per inattivarli; sono alotolleranti e riescono a moltiplicare fino a concentrazioni di sale di 8-10%. Le listeria ha inoltre bisogno di una a_w (*water activity*) minima di crescita: 0,900-0,880. Le listerie inoltre sono in grado di idrolizzare l'esculina della bile.

I batteri resistono alle condizioni del substrato (alimento compreso) secondo la fase vitale in cui si trovano. Quando le listerie sono in fase di attiva duplicazione (*LOG-phase*) essi sono molto sensibili agli stress di qualunque tipo; viceversa, quando *Listeria* passa alla stadio di VBNC (*Viable But Not Culturable cell*) diventa molto più resistente alle condizioni disagiati di pH, *water activity* e/o temperatura del substrato.

Se si prende una coltura di *L. monocytogenes* con carica di 100 milioni di ufc/ml di terreno e lo si porta a pH 3,0 con HCl, la carica del germe scenderà a 100 ufc/ml in circa 50' se il batterio era in fase LOG. Se, invece, il germe era in fase VBNC, ci vorranno oltre 3 ore per farlo passare da 10^8 ufc/ml a circa 10^6 ufc/ml.

L. monocytogenes è la specie più patogena del genere, sia per gli animali che per l'uomo. In UK si stima che nel periodo compreso tra il 1965 e il 2002 sono stati registrati oltre 3.000 casi di listeriosi umana sostenuta da *L. monocytogenes* (McLauchlin *et al.*, 2004).

Alcuni riferimenti bibliografici segnalano, però, la possibile patogenicità per l'uomo anche per altre specie di *Listeria*, soprattutto *L. ivanovii* (2 casi di listeriosi umana in Gran Bretagna negli ultimi 10 anni) e da *L. seeligeri* (1 caso di listeriosi umana in Svizzera) (Rocourt *et al.*, 1987). 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 nelle pecore gravide. In bibliografia troviamo anche rare segnalazioni di casi di listeriosi animale sostenuti da *L. innocua* (Walzer *et al.*, 1994). È quindi probabile che nei prossimi anni *L. ivanovii*, *L. seeligeri* e (forse) *L. innocua* si candidino per diventare degli "patogeni emergenti". *L. monocytogenes* può essere inserita fra gli "evolving pathogen" in quanto si sta adattando a

condizioni ambientali avverse e diverse rispetto quelle tipiche e sta diventando sempre più antibiotico-resistente.

Il genere *Listeria* annovera batteri tendenzialmente anaerobi, poco esigenti e piuttosto resistenti alle condizioni ambientali avverse, anche se sono asporigeni. Le listerie, quindi, sono microrganismi “ubiquitari” molto diffusi nell’ambiente esterno (terreno agricolo concimato, pulviscolo atmosferico, acque superficiali). Da lì passano facilmente a inquinare ortaggi e frutta. Con i foraggi (soprattutto gli insilati) i batteri arrivano facilmente sul mantello e nel contenuto intestinale degli animali a sangue caldo, compresi gli animali da reddito e l’uomo. È normale quindi isolarle dal latte crudo, dalle carni fresche e lavorate, e dai prodotti della pesca. Nei liquami e nei reflui di stalla *L. monocytogenes* può sopravvivere oltre 90 giorni e non più di 30 giorni nel letame solido ben fermentato. Dato la loro grande diffusione nel ambiente esterno le listerie possono inquinare facilmente tutte le superfici di lavoro e gli utensili nelle industrie alimentari. Questo giustifica l’isolamento del batterio anche da alimenti cotti e/o molto elaborate che hanno subito più trattamenti di conservazione. *Listeria* ha grande capacità di insediarsi in modo permanente in ambienti chiusi, per esempio nelle industrie alimentari (McLauchlin *et al.* 2004).

L. monocytogenes è un “*professional pathogen*” (Tauxe, 2002): quando in un alimento si creano le condizioni adatte per la sua proliferazione, l’assunzione di quell’alimento da parte dell’uomo porta allo sviluppo di una malattia alimentare.

I dati epidemiologici USA per il 2004 diffusi dalla rete “*FoodNet*” segnalano un’iniziale declino del numero di episodi di malattie alimentari sostenuti da *Listeria monocytogenes*, ma il batterio continua a essere uno dei più pericolosi per la salute umana. Di

conseguenza, le autorità sanitarie statunitensi hanno inserito *L. monocytogenes* tra i “patogeni alimentari” oggetto del progetto “*Healthy people 2010*” con il quale le autorità governative americane si propongono di assicurare entro quella data la riduzione della prevalenza delle malattie alimentari sostenute da quei batteri tra la popolazione americana (Gandhi e Chikindas, 2007).

3.1 *Listeria monocytogenes*, *Listeria* spp. E FATTORI INTRINSECI DEGLI ALIMENTI

La capacità e la velocità di crescita della *Listeria* dipendono dalle condizioni ambientali e dal tipo e dalla costituzione del suo substrato. Le condizioni del substrato, e in particolare dell'alimento, sono da considerarsi importantissimi perché influenzano l'evoluzione del patogeno nel corso della conservazione del prodotto stesso e permettono di mettere in atto tecniche industriali per inibire la crescita del batterio e stabilizzare il prodotto.

Per frenare o bloccare la crescita di *L. monocytogenes* negli alimenti si può abbassare il pH del prodotto aggiungendo direttamente all'alimento acidi organici deboli o favorendo la moltiplicazione nell'alimento di LAB specifici; questi, fermentando gli zuccheri del substrato, producono acido lattico e/o altri acidi quali acetico, citrico, malico, succinico, ecc.

L'effetto batteriostatico o battericida nei confronti di *Listeria*, varia però a secondo dell'acido organico utilizzato. L'acido acetico, il lattico e il benzoico si sciolgono bene nei grassi, quindi diffonde molto meglio dell'acido citrico all'interno delle cellule batteriche. Ciò giustifica la maggiore efficacia antimicrobica di questi tre composti

acidi rispetto all'acido citrico (di cui sono ricchi tutti i vegetali a partire dal limone).

Il batterio, deve adattarsi alle nuove condizioni di pH acido, con la graduale esposizione a valori sempre più bassi. È dimostrato che se *L. monocytogenes* è esposta bruscamente a un pH 3,5 (condizione letale) buona parte della popolazione cellulare muore se invece il batterio viene prima in contatto con un substrato a pH debolmente acido (intorno a 4,5-5) esso si trova in una condizione di stress subletale e tende ad ambientarsi e a diventare più acidodurico (O'Driscoll *et al.*, 1996)

L. monocytogenes può sopravvivere per oltre 21 giorni nel succo di arancia che in media ha un pH intorno a 3,6 (Gahan *et al.*, 1996). Si deve considerare anche il tempo di esposizione del batterio all'acido e la temperatura ambientale in cui ciò avviene. Perché un acidulante riesca ad inattivare una certa popolazione batterica, bisogna che abbia la possibilità di restare il più a lungo possibile a contatto coi microrganismi. Più la temperatura ambiente è elevata, più il batterio è in grado di opporsi all'effetto letale della sostanza acida.

Koutsoumanis e Sofos (2005) hanno cercato di stabilire quale sia l'effetto svolto dalla carica iniziale di *L. monocytogenes* sulla resistenza del batterio a varie condizioni di temperatura, pH e valore di a_w degli alimenti. Gli autori hanno condotto una serie di test in vitro con un ceppo ATCC di *L. monocytogenes* in varie cariche (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^6 ufc in 300 microlitri di terreno di coltura), facendo variare la temperatura da 4° a 30°C, il pH del substrato da 3,76 fino a 6,44 e il valore di a_w della sospensione batterica da 0,888 a 0,997. La carica iniziale del batterio incide effettivamente sulla crescita del batterio in varie condizioni ambientali. I ricercatori greci hanno dimostrato che:

- Il valore di pH e quello di a_w agiscono in modo sinergico nel limitare o bloccare la moltiplicazione di *L. monocytogenes*,
- Se si sfrutta uno solo di questi due fattori, occorre scendere a valori molto più bassi per ottenere lo stesso effetto batteriostatico o battericida.

La resistenza di *L. monocytogenes* alle condizioni ambientali avverse come il pH del substrato e la temperatura ambientale, può variare sensibilmente da un ceppo all'altro. Questo conferma la notevole variabilità genomica all'interno della specie *L. monocytogenes* e, quindi, la possibile variabilità anche di virulenza nei confronti degli animali e dell'uomo.

I portoghesi Faleiro e coll. (2003) hanno studiato la resistenza di 4 ceppi di *L. monocytogenes* isolati da formaggi portoghesi e di 4 isolati da prodotti a base di carne e due da campioni clinici umani a varie condizioni di pH tra 5,1 e 6,2 in presenza di concentrazioni di NaCl del 2-3,5% tipiche dei formaggi stagionati. I risultati hanno dimostrato che i ceppi di listeria "naturali" variano come sensibilità a questi stress, e che i dati ottenuti sono, a volte, diversi da quelli della bibliografia. L'adattamento del batterio a condizioni di osmolarità maggiori del normale mette *L. monocytogenes* in grado di sopravvivere anche a più bassi valori di pH e viceversa. In particolare, i ceppi isolati che si erano adattati a concentrazioni saline alte diventavano resistenti fino a pH 3,5 e quelli adattati ai pH acidi erano diventati resistenti a concentrazioni fino al 20% di sale.

La capacità di duplicare anche a temperature inferiori a 4°C e prossime a 0°C (psicrotrofia) è una delle caratteristiche più importanti di tutte le specie del genere *Listeria*. Questa capacità è uno dei fattori che stanno alla base della patogenicità di *L. monocytogenes* per l'uomo: riuscendo a moltiplicare (se pure lentamente) anche negli

alimenti conservati a bassa temperatura, *L. monocytogenes* ha più probabilità di altri patogeni di raggiungere cariche infettanti sufficienti per scatenare la listeriosi.

Quando *L. monocytogenes* è portata a temperature più basse del normale, il germe reagisce modificando la composizione degli acidi grassi dei lipidi di membrana, secondo due modalità:

- Riducendo la quota di acidi grassi a catena lunga e aumenta, in proporzione, quella degli acidi a catena breve (che hanno un più basso punto di congelamento),
- Aumentando la quantità di acidi grassi insaturi rispetto ai saturi e la membrana cellulare si mantiene più fluida.

L. monocytogenes è in grado di attuare entrambi questi meccanismi di adattamento alle basse temperature (Mastronicolis *et al.*, 2006)

Sempre più spesso l'industria alimentare mira a frenare la crescita di *L. monocytogenes* aggiungendo agli alimenti specifici additivi alimentari antimicrobici e/o colture di batteri lattici (LAB) selezionati.

3.2 SIEROTIPI DI *Listeria monocytogenes* COME POSSIBILI FATTORI DI VIRULENZA

Le attuali conoscenze riconoscono una diversa struttura antigenica tra i diversi stipiti di *L. monocytogenes*. Prove di agglutinazione e di assorbimento delle agglutinine hanno permesso di riconoscere 5 distinti tipi sierologici indicati come 1, 2, 3, 4a, 4b. Questa classificazione si basa sulla presenza di 15 antigeni somatici O (da I a XV) e 4 flagellari H (A, B, C, D). La presenza di antigeni comuni con altri batteri (*Corynebacterium*, *E. coli*, etc.) può provocare reazioni sierologiche crociate e risultati non corretti nelle prove di identificazione. *L. monocytogenes* elabora fattori tossici quali

emolisina, lipolisina, MPA (*Monocytosis Producing Agent*), esotossina-like ed endotossi-nalike. L'emolisina responsabile della β -emolisi è attiva nei confronti delle emazie umane e di altri mammiferi. Il fattore esotossina-like è emolitico e relativamente termostabile, mentre il fattore endotossina-like ha natura polisaccaridica, provoca edema ed eritema cutanei e svolge azione piretogenica (De Dominicis 2006)

Attualmente il 90% degli episodi di listeriosi nell'uomo è causato essenzialmente dai soli sierotipi 1 e 4. Diversi studiosi pensano che la virulenza del batterio sia connessa al sierotipo. Questa linea di pensiero sta perdendo di valore in questi ultimi tempi. Grazie allo studio del genoma si è capito che la virulenza del batterio dipende da alcuni fattori che non sono strettamente connessi al sierotipo. Verosimilmente, nel mondo i casi di listeriosi alimentare sono causati per la maggior parte dai sierotipi 1 e 4 perché sono in assoluto quelli più diffusi in tutti i continenti, a parte il Giappone. Anche i sierotipi 5 e 6 però possono essere causa di listeriosi (Hof, 2003). Al momento, quindi, si ammette che i sierotipi di *L. monocytogenes* abbiano una virulenza che varia da un sierotipo all'altro, ma che potenzialmente siano tutti ugualmente pericolosi per l'uomo.

Inoltre è un errore pensare che ci siano sierotipi causanti forme di listeriosi grave ed altri che invece causino una malattia piuttosto leggera. Una serie di studi sperimentali portano, invece, a ipotizzare che uno stesso ceppo di *L. monocytogenes* possa modulare la sua virulenza, in diminuendo o in crescendo, passando da un organismo animale all'ambiente esterno e viceversa.

Negli USA Okwumabua e coll. (2005) hanno confrontato sierotipo e profili genomici di 21 ceppi di *L. monocytogenes* isolati in Wisconsin da altrettanti casi di listeriosi che avevano colpito vacche da latte e,

occasionalmente, pecore o capre con forme cliniche di meningite, meningoencefalite, mastite e aborto. Ipotizzando che si fosse di fronte a ceppi di *L. monocytogenes* ad alta virulenza, gli autori americani hanno verificato se le caratteristiche di patogenicità di questi stipiti batterici potessero comportare, in qualche modo, un pericolo altrettanto grave per la salute umana, qualora un ceppo fosse arrivato all'uomo con gli alimenti.

Cinque dei ceppi studiati appartenevano al sierotipo 1/2a, sei al sierotipo 1/2b, nove al 4b mentre uno non era ulteriormente tipizzabile. Un ceppo isolato da capre, due isolati da bovini e uno isolato da ovini presentavano lo stesso profilo genomico: indicando che il batterio non presenta quasi mai una spiccata specificità per una specie animale soltanto. Confrontando i profili genomici ottenuti dai ceppi "animali" con i profili di altri ceppi che avevano causato seri episodi di listeriosi umana negli Stati Uniti, è emerso che sei dei 21 ceppi testati (29% del totale) possedevano un profilo genomico sovrapponibile a quello dei ceppi "umani". Si conferma sempre di più l'ipotesi che:

1. Non esistono ceppi di *L. monocytogenes* tipici degli animali e altri tipici dell'uomo,
2. I ceppi responsabili di listeriosi animale non manifestano un tropismo particolare per una specie rispetto alle altre,
3. Esistono identità genomiche tra ceppi responsabili di listeriosi animale e altri responsabili di malattia nell'uomo,
4. Gli alimenti di origine animale sono un importante veicolo di trasmissione di questi ceppi dal mondo animale a quello umano,
5. La resistenza del batterio nell'ambiente esterno favorisce la grande diffusione, ed è possibile che ceppi di origine animale inquinino

anche ortaggi e frutta, facendo sì che anche questi alimenti diventino un importante veicolo di infezione alimentare umana.

Negli Stati Uniti Gendel (2004) ha esaminato con 149 ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da alimenti, e ne ha messo a confronto i profili in base alla distribuzione geografica sul territorio della confederazione statunitense. Si è così potuto stabilire che alcuni (pochi) ribotipi di *L. monocytogenes* sono diffusi uniformemente su tutto il territorio americano, mentre la maggior parte ha una diffusione più ristretta, che interessa singoli stati o addirittura poche contee all'interno di uno stato.

3.3 *Listeria monocytogenes* E LA SALUTE UMANA

Nel 95% dei casi la listeriosi nell'uomo è una malattia provocata dal consumo di alimenti dove *L. monocytogenes* o (più raramente) le altre specie di *Listeria* hanno trovato le condizioni ottimali per la loro moltiplicazione. È molto raro che l'uomo contragga la listeriosi manipolando animali a loro volta affetti da listeriosi e rarissimi sono i casi di listeriosi contratta in ambito ospedaliero, per passaggio dell'infezione da persone ammalate a persone sane. In quest'ultimo caso, si tratta di medici ostetrici e personale infermieristico che hanno contratto la listeriosi per avere seguito il parto di donne ammalate di listeriosi (nel canale del parto, in questi casi, sono presenti cariche altissime del batterio).

Sino a qualche anno fa, si sosteneva che *L. monocytogenes* è un "patogeno opportunista" e che la listeriosi è una malattia tipica delle persone con sistema immunitario indebolito. Invece, la listeriosi può colpire anche persone normalmente immunocompetenti. La gravità della malattia e soprattutto la sua letalità è maggiore nelle persone con un sistema immunitario compromesso o ancora non del tutto

immunocompetente. Si stima che nei soggetti immunocompromessi *L. monocytogenes* possa indurre tassi di letalità che arrivano fino al 30-40% dei soggetti colpiti, valore che supera quello di altri agenti di malattia alimentare come *Salmonella* spp. e che si avvicina a quelli tipici dei ceppi di *Clostridium* produttori di neurotossina botulinica (BONT). Il tasso di letalità è molto più basso (in media, meno del 5%) nei casi di listeriosi in persone immunocompetenti.

La listeriosi è una malattia alimentare piuttosto frequente: la sua incidenza tra la popolazione è di circa 0,7-1 caso/100.000 abitanti se si prendono in considerazione le persone in normali condizioni di salute (soggetti immunocompetenti). La probabilità di contrarre l'infezione 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.

Le persone immunocompetenti possiedono, nel loro intestino, linfociti attivi che sono per lo più in grado di inattivare il batterio. È verosimile, che la maggior parte di noi assuma quasi ogni giorno basse cariche del batterio tramite un qualsiasi alimento, senza che ne consegua una rilevanza clinica. In altre occasioni, si può manifestare qualche caso di enterite di breve durata, che non permette allo stesso paziente e al medico di comprendere che si trattava di listeriosi.

Tabella n°1

Prevalenza della listeriosi (per 100.000 abitanti) per differenti categorie di persone a rischio

Soggetti immunocompetenti	0,7
Persone anziane (> 70 anni)	2
Alcolisti e diabetici	5
Ipersideremici	5
Donne in gravidanza	12
Pazienti affetti da neoplasia	15
Terapia a base di corticosteroidi	20
Pazienti con lupus 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	1.000

Da Hof (2003), modificata.

Per quanto riguarda l'incidenza della listeriosi sulla popolazione, i dati variano passando da un paese all'altro. In Gran Bretagna si è stimato che tra il 1995 e il 1999 la listeriosi abbia colpito in media 1,7-2,4 persone per ogni milione di abitanti, mentre in Francia e Stati Uniti questa percentuale è di molto superiore (rispettivamente, 5,4 casi e 9,4 casi per milione di abitanti) (Goulet *et al.*, 2001; Mead *et al.*, 1999). Una parte variabile dei casi di listeriosi sfugge, alle rilevazioni delle autorità sanitarie, specialmente i casi subclinici che si manifestano con sintomi di gastroenterite.

Spesso, nelle forme subcliniche non si effettua la ricerca del batterio né nelle feci diarroiche dei pazienti, né nel loro sangue. Secondo Adak e coll. (2002) i casi di listeriosi che effettivamente colpiscono ogni anno gli abitanti della Gran Bretagna sono almeno il doppio di quelli che le autorità sanitarie britanniche registrano. *L. monocytogenes* è terza, in ordine di importanza dopo *Campylobacter* e *Salmonella*, come agente di episodi di malattia alimentare che portano al ricovero in ospedale, e quarta come causa di decesso di pazienti.

Il 10-20% di tutti i casi clinici di listeriosi che arrivano all'attenzione delle autorità sanitarie sono forme che interessano le donne in gravidanza o i neonati. Il 15-25% di questi processi porta alla morte del feto in utero e conseguente aborto, mentre nel 70% dei casi la gravidanza viene portata a termine, ma il neonato è affetto a sua volta da listeriosi. In una ridotta percentuale dei casi (non più del 5%) si rileva batteriemia nella donna gravida, senza coinvolgimento del feto in utero (Smerdon *et al.*, 2001).

Per quanto riguarda il sesso, gli uomini sembrano essere lievemente più a rischio delle donne e l'incidenza della listeriosi sembra accentuarsi nelle persone che hanno più di 55 anni di età (McLauchlin *et al.*, 2004).

Secondo McLauchlin e coll. (2004), in Inghilterra e Galles l'incidenza della listeriosi nelle persone adulte immunocompetenti era stimata, a metà degli anni '90, in 2-3 casi/milione di abitanti. Hitchins e Whiting (2001) hanno registrato per gli USA un valore di 5 casi/milione di abitanti, sempre riferendosi a casi clinici di listeriosi in persone adulte sane. Il resto della bibliografia mondiale non si discosta più di tanto da questi valori. In Israele, Siegman-Igra e coll. (2002) hanno calcolato un'incidenza media di 6 casi/milione di abitanti ogni anno nel periodo 1995-1999. L'incidenza dei casi clinici di listeriosi aumenta

considerevolmente tra le categorie di persone “a rischio” elencate in Tabella 1. In Francia l’incidenza della listeriosi è stimata in 2.000 casi/milione di abitanti fra i pazienti sottoposti a trapianto di organo, in 130 casi/milione di abitanti fra gli ammalati di cancro sottoposti a chemioterapia e in 14 casi/milione di abitanti tra gli anziani con oltre 65 anni di età (Rocourt *et al.*, 2000).

Il divario che si registra tra numero di casi clinici di listeriosi segnalati dalle autorità mediche e il numero di rilevamenti del batterio negli alimenti, potrebbe avere anche un’altra spiegazione. Ultimamente si è visto che la listeriosi può manifestarsi nell’uomo anche con sintomi di enterite acuta non associati a forme di aborto o meningite. Quindi, una parte di casi di listeriosi potrebbe sfuggire al riconoscimento dei medici ancora non del tutto informati che una diarrea di origine alimentare potrebbe essere causata da *L. monocytogenes*, oltre che *Salmonella* o altri batteri enterici.

Un aspetto molto importante da considerare è che nella maggior parte dei casi, i campioni di alimento che risultano positivi per la presenza di *L. monocytogenes* presentano una carica microbica specifica molto bassa. È probabile che nell’arco della nostra vita ciascuno di noi ingerisca casualmente una serie di alimenti inquinati con una ridotta carica del microrganismo, senza che ciò abbia conseguenze sul piano clinico. Negli USA, Hitchins (1996) ha sviluppato una statistica basandosi sui dati raccolti dalla bibliografia internazionale, per stimare la probabilità che il consumatore americano medio ha di “incontrare” una *L. monocytogenes* con gli alimenti ed eventualmente di ammalarsi di listeriosi. Tenendo presente la dieta dell’americano medio e l’attuale diffusione di *L. monocytogenes* negli alimenti in generale, l’autore ha stimato che in un anno un soggetto adulto ha la probabilità di mangiare dai 105 ai 341 alimenti inquinati da basse

cariche di *L. monocytogenes*. Per carni rosse e pollame le “occasioni di incontro” sono 21 e, rispettivamente, 37 e 53 sono le probabilità per i salumi (si intende riferito a prodotti consumati crudi o poco cotti). Il valore è prossimo a 0 se le carni sono destinate a essere consumate previa sufficiente cottura.

Altri ricercatori avevano ipotizzato che nei soggetti immunocompetenti l’assunzione continua per via alimentare di basse cariche di *L. monocytogenes* potrebbe persino avere effetti benefici: stimolerebbe continuamente le difese immunitarie e favorirebbe la sintesi di nuove IgA protettive a livello di intestino. In modo che il corpo umano rinnovi la “vaccinazione naturale”, così come si fa nel caso della vaccinazione vera e propria, allorché si fa un “richiamo”. Non sempre però lo stesso organismo immunocompetente reagisce bene; in esso (e soprattutto nei soggetti debilitati o immunocompromessi) la proliferazione del batterio nel fegato può sfuggire al controllo immunitario, dando batteriemie a bassa carica che a loro volta portano alla colonizzazione secondaria di altri organi (cervello e utero gravido) nonché alle forme clinicamente evidenti.

I fattori che possono favorire l’inquinamento di un alimento da *L. monocytogenes* e l’aumento dei casi di listeriosi tra gli umani sono molti:

- La vita media umana si allunga e aumenta in proporzione il numero di persone che si collocano nella fascia di età degli anziani (con oltre 70 anni di età).
- Si modificano gradualmente le abitudini alimentari.
- Le industrie alimentari utilizzano sempre più spesso sistemi di conservazione sempre più blandi non sufficienti nel bloccare del tutto la crescita microbica (*mild technologies*).
- Si consumano sempre più spesso alimenti *Ready-to-Eat* (RTE),

- Si registra un grande afflusso di materie prime dai paesi poveri produttori ai paesi ricchi “trasformatori”.
- Cresce la domanda dei consumatori di alimenti nuovi, con il conseguente aumento delle importazioni di nuovi alimenti dall'estero e la diffusione dei cibi “etnici”.

3.4 *Listeria monocytogenes*, *Listeria* spp. E ALIMENTI

Gli alimenti che possono causare la listeriosi umana sono molteplici in quanto il batterio è ubiquitario nell'ambiente.

L'inquinamento degli alimenti può avvenire attraverso numerose vie e di conseguenza viene isolata da numerosi alimenti:

- (1) materie prime come carni fresche, latte crudo, prodotti della pesca, ortaggi e frutta
- (2) prodotti semilavorati destinati a ulteriore trasformazione nelle industrie alimentari
- (3) prodotti finiti pronti per il consumo.

In base alla bibliografia esistente si suddividono gli alimenti in due gruppi: quelli che facilmente sono all'origine di listeriosi umana e quelli che non lo sono quasi mai (Tabella n°2).

Tabella n°2 Ripartizione degli alimenti come possibile fonte di listeriosi

Alimenti che sovente causano listeriosi	Alimenti che di rado causano listeriosi
<p>carni fresche (in particolare quelle di pollo e tacchino)</p> <p>prodotti a base di carne in genere, soprattutto i prodotti di salumeria freschi o poco stagionati, ma anche alimenti quali paté e alimenti analoghi</p> <p>prodotti di gastronomia (maionese, insalata russa, tramezzini e simili)</p> <p>lattuga, funghi freschi e, più in generale, tutti i vegetali crudi o sottoposti a blandi trattamenti di conservazione</p> <p>latte crudo e prodotti da esso derivati, tra cui in particolare i formaggi molli ma anche quelli a media stagionatura, se prodotti con latte crudo</p> <p>prodotti della pesca, soprattutto quelli leggermente salati e affumicati (salmone e trota affumicati)</p> <p>alimenti cotti, se sono conservati a lungo a temperature non corrette dopo la cottura e prima di essere consumati</p>	<p>tutti i cibi cotti, se sono consumati entro breve tempo dopo la cottura</p> <p>latte trattato termicamente e latte microfiltrato; yogurt e altri lattici fermentati, formaggi a pasta dura e molto stagionati</p> <p>cioccolato, marmellate e confetture, prodotti di pasticceria secchi</p> <p>carote, mele e pomodori crudi, per la loro capacità di inattivare il batterio (contengono un polipeptide in grado di frenare efficacemente la proliferazione delle listerie)</p>

In Portogallo, Leite e coll. (2005) hanno cercato correlazioni tra ceppi di *L. monocytogenes* isolati da un tipico formaggio portoghese a base di latte ovino e i casi di listeriosi umana documentati in Portogallo. Hanno studiato il genoma di 94 ceppi di *L. monocytogenes* isolati da altrettanti campioni di formaggio stagionato, e 15 ceppi isolati da pazienti affetti da listeriosi. Le analisi sierologiche hanno evidenziato la presenza di ben 4 differenti sierotipi. Malgrado il fatto che i formaggi inquinati da *Listeria* fossero stati prodotti in sette differenti caseifici indipendenti l'uno dall'altro, il confronto dei genotipi ha fatto emergere una distribuzione dei ceppi di *L. monocytogenes* assai omogenea, il che ha portato gli autori portoghesi a concludere che in tutta la regione sono diffusi cloni di *L. monocytogenes* praticamente “stanziali” che continuano a circolare tra un allevamento e l'altro, nella medesima regione. Non si sono, invece, riscontrate correlazioni genomiche tra i ceppi isolati dai formaggi e quelli responsabili di listeriosi umana.

In Italia Manfreda e coll. (2005) hanno condotto studi di ribotipizzazione su ceppi di *L. monocytogenes* isolati da uno dei più famosi formaggi stagionati italiani, il Gorgonzola. In totale sono stati esaminati 1.656 formaggi, dei quali il 90% al momento del confezionamento, e il 10% a fine vita commerciale del prodotto. Sono stati isolati 17 ceppi di *L. monocytogenes* dai campioni di formaggio al momento dell'immissione in commercio, e 6 dal Gorgonzola a fine vita commerciale.

I risultati cui i ricercatori sono pervenuti si possono così riassumere:

1. L'incidenza di *L. monocytogenes* nei formaggi subito dopo il confezionamento è stata del 2,1% mentre nel caso dei formaggi a fine vita commerciale tale frequenza è più che raddoppiata, arrivando al 4,8%;
2. Il 16,7% dei ceppi di *Listeria* isolati dai formaggi era identica, come profilo ribosomiale, a quello di ceppi riconosciuti come causa di listeriosi sporadica nei consumatori;
3. L'incidenza di positività al batterio raddoppia durante la vita commerciale del prodotto. Questo indica che incrementando la *shelf-life* del Gorgonzola si rischia di favorire la proliferazione, anche se lenta, del batterio.

In Grecia Rogga e coll. (2005) hanno valutato l'indice di sopravvivenza di *L. monocytogenes* in un tipico formaggio greco, il *Galotyri*, prodotto con latte di pecora o di capra e consumato per lo più fresco, dopo brevissima stagionatura e maturazione. Al termine delle prove sperimentali, gli autori hanno concluso che una *L. monocytogenes* arrivata al formaggio nel corso della produzione non potrebbe moltiplicare, vista la salinità del mezzo e i suoi ridotti valori di pH, ma potrebbe sopravvivere, in cariche non superiori a 100 ufc/g di formaggio pronto al consumo.

Maijälä e coll. (2001) hanno descritto una serie d'episodi di listeriosi verificatisi in Finlandia tra giugno 1998 e aprile 1999, che hanno coinvolto soggetti ospedalizzati con uno stato immunitario compromesso. Gli episodi furono provocati dal consumo di confezioni monodose di burro prodotto in un unico stabilimento, al cui interno era già stata individuata un anno prima la presenza di *L. monocytogenes*. Gli episodi, hanno colpito in totale 25 persone. Il sierotipo in causa era sempre lo stesso. La dose infettante stimata

variava tra gli $1,4 \times 10^3$ ufc/die agli $2,2 \times 10^3$ ufc/die, se si considerano i dati di consumo singolo per i pazienti forniti dalla cucina dell'ospedale, oppure compresa fra $2,2 \times 10^4$ e $3,1 \times 10^5$ ufc/die, se si considerano i dati rilevati nelle singole confezioni di burro (fino a un massimo di 11.000 listerie/g di burro). Le condizioni di salute dei pazienti e l'elevato contenuto di grasso nel burro, hanno favorito la comparsa degli episodi di listeriosi.

Nørrung e coll. (1999) riportano i dati sulla prevalenza di *L. monocytogenes* in vari prodotti alimentari in Danimarca. Su un totale di oltre 15.000 campioni d'alimenti analizzati, i piatti precucinati, le preparazioni a base di maionese e le verdure già preparate hanno fatto segnare medie d'isolamenti positivi molto evidenti (13% per i piatti precucinati, 12% per i vegetali pronti a consumo e il 5,6% per i prodotti con maionese). Nella stragrande maggioranza dei casi, l'inquinamento iniziale del batterio era compreso tra 10 e 100 ufc/g e che soltanto raramente si raggiungevano cariche che andavano oltre le 100 ufc/g.

3.5 *L. monocytogenes*: SISTEMI DI CONSERVAZIONE DEGLI ALIMENTI, ANTIBIOTICI E DISINFETTANTI

King e coll. (2003) hanno dimostrato che l'atmosfera di crescita di *L. monocytogenes* e la fase di crescita della stessa (esponenziale o stazionaria) possono influenzare in modo determinante la sopravvivenza del batterio in condizioni estreme di pH, imitando le condizioni che il batterio incontra quando penetra nell'organismo e si trova a superare la barriera gastrica. Hanno visto che il pericolo di infezione è maggiore per gli alimenti *minimally processed*, ossia conservati a temperatura di refrigerazione e confezionati in atmosfera protettiva. Se si realizzando le condizioni minime sufficienti per la

crescita del batterio, infatti, questi alimenti non solo consentono la sopravvivenza del batterio, ma possono anche permetterne la crescita fin oltre 100 ufc/g. Il confezionamento dei prodotti alimentari in MAP con atmosfere protettive ricche di CO₂ ha solo un effetto batteriostatico nei confronti di *L. monocytogenes*.

A differenza di *Salmonella*, *L. monocytogenes* è stata considerata un batterio non antibiotico-resistente, sensibile ai comuni antibiotici utilizzati in terapia umana e veterinaria. Di recente, però, si è dimostrato che esistono ceppi resistenti a cloramfenicolo, eritromicina, streptomina, tetracicline, vancomicina e trimethoprim, e ceppi del genere sono stati rivenuti anche da alimenti.

In Italia, Aureli e coll. (2003) hanno valutato la sensibilità agli antibiotici di 148 ceppi di *L. monocytogenes* isolati nel biennio 1996-1997 da salmone affumicato (6,8%), latte crudo e formaggi freschi (24,3%), carni avicole fresche (35,8%), carni rosse e prodotti a base di carne (33,1%). I risultati ottenuti indicano che il batterio sta diventando sempre più antibiotico-resistente ereditando i geni dell'antibiotico-resistenza da altri batteri Gram positivi.

Walsh e coll. (2001) hanno esaminato 1001 ceppi di *Listeria* isolati da alimenti di vario genere venduti al dettaglio, per verificare quanti di essi fossero resistenti agli antibiotici, concludendo che il 10,9% di essi era resistente a uno o più antibiotici.

Mayrhofer e coll. (2004) hanno valutato 304 ceppi di *L. monocytogenes* isolati da altrettanti campioni di carni, senza mai rilevare alcun ceppo antibiotico-resistente. Prazak e coll. (2002) hanno testato l'antibiotico-resistenza di 21 ceppi di *L. monocytogenes* isolati da cavoli, acqua e campioni ambientali, dimostrando che 20 (il 95%) era resistente a uno o più antibiotici. È il primo studio che rivela

l'esistenza di ceppi di *L. monocytogenes* resistenti a più antibiotici insieme (multiresistenti).

Per quanto riguarda la resistenza di *L. monocytogenes* ai disinfettanti e ai detergenti utilizzati per le sanificazioni nelle industrie alimentari, i dati della bibliografia sono i seguenti.

Mereghetti e coll. (2000) hanno esaminato 97 ceppi di *L. monocytogenes* isolati da ambiente, alimenti, animali e casi di listeriosi umana, evidenziando che una piccola percentuale di essi (7 per la precisione) si dimostrava resistente nei confronti di benzalconio cloruro e di cetrimide. Gli autori hanno trovato nel genoma di quei ceppi un gene specifico (*mdrL*) che è quello che conferisce al batterio l'attivazione di una specifica pompa ionica che gli permette di diventare resistente a quei disinfettanti.

To e coll (2002) hanno valutato l'adattamento di *L. monocytogenes* ai QAC di ceppi di *L. monocytogenes* dopo uno stress subletale che consisteva nel mettere a contatto i batteri preliminarmente con ridotte concentrazioni di benzalconio cloruro, considerando 2 ceppi già resistenti e 4 inizialmente sensibili al disinfettante. Dopo il "periodo di adattamento" iniziale la MIC dei ceppi sensibili era diventata 4 volte superiore e quella dei ceppi resistenti era raddoppiata, segno che lo stress subletale aveva funzionato a favore del batterio.

È ipotizzabile che *L. monocytogenes* diventi resistente a qualche disinfettante per "reazione crociata" ossia venendo in contatto con altri detergenti o disinfettanti. Ciò metterebbe in seria difficoltà la pratica della rotazione dei disinfettanti nell'industria alimentare.

Romanova e coll. (2002) hanno testato la resistenza di 90 ceppi di *L. monocytogenes* (parte di provenienza clinica e parte isolati da campioni di alimenti) ai più comuni sanificanti utilizzati nell'industria alimentare. 5 di questi ceppi è risultata resistente ai disinfettanti e nel

loro genoma di è rilevata la presenza di 2 plasmidi. Anche in questo caso, i ceppi resistenti contenevano il gene *mdrL* che codifica l'attivazione della pompa ionica specifica.

4. PATOGENESI DELLA LISTERIOSI

Ancora oggi, non sappiamo con certezza quale sia l'effettiva patogenesi della listeriosi. È probabile che la comparsa della malattia sia condizionata da una serie di fattori: il variare del ceppo batterico in causa, la specie ospite, il cambiare dell'organo colpito.

L. monocytogenes è ubiquitaria nell'ambiente, col tempo si è adattato a invadere le cellule degli organismi superiori. È probabile, però, che *L. monocytogenes* si sia abituata a penetrare e vivere nelle cellule eucariote di esseri viventi invertebrati che vivono abitualmente nel suolo. I ricercatori ne hanno concluso che il batterio non è particolarmente adatto alle cellule dei vertebrati superiori e che, di conseguenza, ha sviluppato una serie di meccanismi per infettarne le cellule. Ciò spiega anche perché la carica infettante di *L. monocytogenes* può variare considerevolmente da un caso all'altro di malattia alimentare (McLauchlin *et al.*, 2004).

Il numero di casi di listeriosi che si registrano ogni anno è di molto inferiore a quello degli isolamenti del batterio dagli alimenti. Questo andamento è giustificato da due ordini di motivi:

Il non riconoscimento clinico della listeriosi da parte dei medici, soprattutto nei soggetti immunocompetenti,

l'inquinamento iniziale degli alimenti è quasi sempre molto contenuto (poche unità di *Listeria* per grammo di prodotto).

Hof (2003) ha studiato l'epidemiologia della *L. monocytogenes* che pur essendo la specie patogena, non tutti i ceppi si possono considerare tali.

L'intestino è la principale porta di ingresso del microrganismo nell'uomo, ma sono documentate anche altre possibili vie di infezione.

Il batterio, infatti, può penetrare nel nostro organismo anche attraverso

piccole ferite di cavo orale, faringe o comunque delle prime vie alimentari: è dimostrato sperimentalmente che negli ovini casi di encefalite da *L. monocytogenes* possono insorgere per penetrazione del batterio attraverso focolai di carie dentale con la risalita del batterio fino al cervello attraverso le radici periferiche del nervo trigemino. Nell'uomo mancano prove certe che le listerie possano seguire questa medesima via di penetrazione nell'organismo, ma il fatto è verosimile (McLauchlin *et al.*, 2004).

Nella maggior parte dei casi, la listeriosi è scatenata dalla penetrazione del batterio attraverso la mucosa intestinale. Il batterio quindi deve superare la barriera gastrica. L'alimento inquinato deve superare lo stomaco e sovente la digestione lo può inattivare, ma è evidente che ciò non accade sistematicamente. Le terapie antiacide per prevenire l'iperacidità gastrica costituiscono uno dei tanti fattori predisponenti. Un altro fattore da prendere in considerazione è dato dal notevole potere tampone che alcuni alimenti hanno rispetto ad altri, potere che diminuirebbe l'efficacia del pH acido dello stomaco.

Arrivato nell'intestino, il microrganismo trova il modo di sopravvivere all'azione antimicrobica dei sali biliari, aderisce alla mucosa intestinale e poi la invade. Questa invasione dell'intestino non è necessariamente associata alla comparsa di focoli di enterite e di lesioni macroscopiche alla mucosa intestinale. Il batterio può penetrare negli enterociti e moltiplicare, oppure si insinua tra le cellule, scollandone le tight junction, e da lì arriva ai capillari sanguigni o linfatici.

Come altri patogeni alimentari (*Salmonella*), *L. monocytogenes* tende a insinuarsi nel citoplasma dei leucociti del sangue e dei tessuti, resistendo alla lisi enzimatica con una serie di meccanismi biochimici. In particolare, i macrofagi sembrano essere le cellule bersaglio delle

listerie. Si è però appurato che *L. monocytogenes* è un patogeno intracellulare facoltativo, in grado di penetrare all'interno di tutte le cellule dell'organismo umano e di moltiplicare al loro interno, fatta eccezione per i soli granulociti neutrofili, che sono fortemente battericidi e quindi in grado di eliminare il batterio (Flodrops *et al.*, 2005).

Più raramente, la listeriosi può anche essere contratta dall'uomo per inalazione di aerosol del batterio. Proprio nel primo focolaio di listeriosi umana epidemica da consumo di crauti acidi, segnalato da Schlech e coll. in Canada nel 1983, uno dei pazienti colpiti sviluppò una grave forma di polmonite, contratta molto probabilmente per inalazione diretta del batterio (McLauchlin *et al.*, 2004).

Le listerie patogene entrano nell'organismo essenzialmente per via digerente, insieme con l'alimento inquinato e il loro primo organo bersaglio è il fegato, nel quale le listerie migrano e si insediano (Vásquez-Boland *et al.*, 2001).

Nonostante la resistenza del batterio e le sue capacità di sfuggire agli enzimi lisosomiali dei macrofagi, si stima che una volta arrivate al sangue, il 90% delle listerie sia comunque distrutto dalla fagocitosi cellulare dei monociti e dalla conseguente lisi enzimatica. Il restante 10%, è catturato dalle cellule di Kupffer del fegato e dai macrofagi presenti nella milza. Al loro interno il batterio di solito moltiplica attivamente, scatenando un'intensa risposta infiammatoria cellulomediata (Flodrops *et al.*, 2005).

Questa ridotta carica microbica infettante iniziale, può avere due differenti destini:

- I linfociti citotossici CD8 attaccano gli epatociti infettati e li distruggono, liberando i batteri negli spazi intercellulari. Qui essi sono rapidamente distrutti dai granulociti neutrofili sensibilizzati, e

l'infezione evolve verso la guarigione. In genere, questa forma di infezione decorre in forma clinicamente silente, se il soggetto è immunocompetente;

- Se la carica infettante iniziale era molto elevata e la frazione di *L. monocytogenes* sopravvissuta all'attacco dei monociti è sufficiente, o se si tratta di una persona non immunocompetente (es. donna in gravidanza), l'infezione degli epatociti non viene tenuta sotto controllo dai meccanismi di difesa cellulo-mediati. Le listerie infettano buona parte dell'organo con uno specifico meccanismo. Da lì i batteri possono diffondere nel sangue raggiungendo altri organi e apparati, quali la placenta e il feto, o il sistema nervoso centrale, che cercano di colonizzare, scatenando aborto o forme di meningoencefalite.

Il meccanismo con cui *L. monocytogenes* riesce a penetrare nelle cellule dell'organismo ospite, a moltiplicare al loro interno e a passare da una cellula all'altra senza entrare in contatto con gli anticorpi dell'organismo, è specifico ed efficace.

Le sostanze che intervengono in questo meccanismo d'azione e che, quindi, sono alla base della virulenza di *L. monocytogenes* sono dei polipeptidi poco complessi: tre "internaline" A, B e C, due fosfolipasi, un enzima (listeriolisina O) e la "proteina ActA". Il processo di invasione delle cellule di un organo segue una sequenza ben precisa, che si può ripetere infinite volte.

- *L. monocytogenes* utilizza le internaline per agganciarsi alla membrana di una cellula e si fa fagocitare al suo interno;
- 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;

- a) Il batterio accumula i filamenti di actina contrattile a uno dei due poli, assumendo l'aspetto di una cometa; grazie alle contrazioni dei filamenti di actina *L. monocytogenes* estroflette la membrana della cellula ospite e inflette quella della cellula adiacente, penetrandovi;
- b) *L. monocytogenes* si trova di nuovo all'interno di un vacuolo nel citoplasma di un'altra cellula e il ciclo si ripete.

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.

La virulenza di *L. monocytogenes* è connessa anche alla sua capacità di sintetizzare tutte quelle sostanze che gli permettono di attuare questo ciclo di invasione intracellulare. Questa capacità è codificata nel genoma del batterio.

Per valutare meglio la virulenza di un ceppo di *L. monocytogenes*, è opportuno analizzare il suo DNA ,che ci permette di individuare le sequenze geniche che codificano la sintesi di quei composti specifici.

Secondo Johansson e coll. (2002), *L. monocytogenes* è genomicamente in grado di sintetizzare una importante quantità di proteine che le permettono di invadere lentamente le cellule dell'ospite e di danneggiarle: 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 latente 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 del gruppo degli attivatori di trascrizione. Quando il batterio si trova nell’ambiente esterno, a temperature inferiori a 30°C i geni che codificano la sintesi dei fattori chimici di virulenza continuano a essere trascritti, ma in misura molto ridotta. Quando invece il batterio penetra in un vertebrato superiore e la temperatura ambientale arriva oltre 37°C la trascrizione dei geni di virulenza procede in modo molto più attivo e veloce.

I francesi Olier e coll. (2004) hanno studiato i nuovi meccanismi grazie ai quali *L. monocytogenes* può superare la barriera gastrica e sopravvivere nell’intestino umano. Per adattarsi ai valori di pH troppo acidi, *L. monocytogenes* può mettere in atto vari meccanismi. Può modificare gli scambi ionici della sua membrana, per eliminare verso l’esterno un eccesso di protoni; ma può anche utilizzare un sistema di glutammato-decarbossilasi (GAD) analogo a quello osservato in *E. coli*. Quando la cellula si trova 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. Il risultato è quello di usare una serie di protoni intracellulari in questo sistema e diminuirne la concentrazione intracellulare, alcalinizzando nel contempo il mezzo esterno, visto che il GABA è meno acido dell’acido glutammico. La valutazione dei livelli di attività del sistema GAD nei vari ceppi di *L. monocytogenes* può essere vista come un sistema per valutare indirettamente la capacità del singolo ceppo di adattarsi in misura più o meno accentuata a un’acidificazione del substrato.

Olier e coll. (2004) hanno studiato 14 ceppi di *L. monocytogenes* isolati da altrettanti portatori asintomatici umani e ne hanno valutato l’attività del sistema GAD, scoprendo che i livelli di attività di questo

sistema variano al variare del ceppo in causa. Variazioni analoghe del sistema GAD sono state riscontrate anche in 18 ceppi di *L. monocytogenes* isolati da pazienti umani colpiti da listeriosi mentre, a confronto, 13 ceppi di *L. monocytogenes* isolati da alimenti e ambienti di produzione hanno fatto segnare livelli di attività del sistema GAD molto più bassi. Questo significa che i ceppi in grado di dare listeriosi sembrano avere il sistema GAD sempre attivo mentre i ceppi che circolano nell'ambiente, meno virulenti, hanno un'attività di GAD molto meno spiccata.

Il secondo sistema enzimatico che permette a *L. monocytogenes* di sopravvivere meglio nell'intestino umano e animale è denominato BSH (*Bile Salt Hydrolase*). Grazie ad esso il batterio è in grado di scindere i sali biliari coniugati, liberando acidi biliari semplici che hanno effetto batteriostatico e battericida molto più basso. Quindi tale meccanismo fornisce alla *L. monocytogenes* una possibilità in più sopravvivere anche nel contenuto intestinale e persino all'interno della vescichetta biliare. L'attivazione di questo sistema enzimatico è sempre sotto controllo del fattore di attivazione PrfA.

4.1 LA CARICA INFETTANTE DI *L. monocytogenes*

Per stabilire la carica infettante di un qualunque patogeno alimentare si possono adottare due sistemi:

- a) somministrare a volontari umani dosi crescenti del batterio potenzialmente patogeno e verificare a quale carica compaiono i primi sintomi di malattia. Per questo genere di prove si impiegano volontari in età adulta e in perfette condizioni di salute. Di conseguenza, i valori di carica infettante che si ottengono sono, di regola, sovrastimati rispetto a quella che può essere la carica infettante sufficiente per scatenare la malattia alimentare in soggetti

con resistenze immunitarie compromesse o comunque più predisposti di altri a sviluppare la malattia.

- b) arrivare alla stima della carica infettante per deduzione *a posteriori*, quando si riesce a rintracciare gli avanzi degli alimenti che sono stati causa di tossinfezione e a quantificare la “carica” microbica specifica presente in questi residui di cibo. Confrontando i dati epidemiologici relativi a questi focolai, si può desumere che in generale *L. monocytogenes* può dare origine a un episodio epidemico o sporadico di malattia quando è assunta, insieme con un alimento, in cariche che vanno da un minimo di 100-1.000 ufc/g di alimento fin oltre 10^8 ufc/g.

Quanto più è elevata la quantità del batterio assunto con l'alimento, tanto maggiori sono le probabilità che la persona contragga la listeriosi. Sappiamo ormai abbastanza bene che 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). Perché il batterio possa raggiungere le cariche elevate necessarie per scatenare una malattia clinicamente evidente, occorre che i pochi batteri inizialmente presenti nell'alimento possano moltiplicare, crescendo progressivamente di numero. Diventano 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.

I valori di carica infettante che si possono desumere dalla bibliografia sono stati quasi sempre rilevati in occasione di episodi “epidemici” di listeriosi, venuti all'attenzione delle autorità sanitarie per la loro gravità come numero di persone colpite. Mancano però dati sugli episodi sporadici che interessano una o due persone al massimo e che

non sono stati registrati dalle autorità sanitarie perché sfuggono alla loro attenzione.

In conclusione:

- c) una persona può sviluppare una listeriosi clinicamente evidente se ingerisce un alimento che contiene una carica infettante di *L. monocytogenes* che può variare da meno di 1.000 fino a oltre 10^8 ufc/g, nel caso di persone appartenenti alle categorie più “a rischio”, è probabile che sia sufficiente una carica microbica relativamente bassa per scatenare la malattia;
- d) a parità di carica microbica infettante, è probabile che sulla comparsa della listeriosi clinica intervengano fattori quali la virulenza del batterio e le caratteristiche dell'alimento stesso;
- e) gli studi epidemiologici condotti in questi ultimi venti anni evidenziano che spesso gli alimenti fonte di listeriosi umana erano stati sottoposti a un blando trattamento termico di cottura e/o a successive manipolazioni.

Questi trattamenti da un lato avevano inibito la flora microbica tipica delle materie prime e dall'altro avevano consentito a *L. monocytogenes* di inquinare la matrice alimentare. In genere si tratta sempre di alimenti che sono poi consumati senza ulteriore cottura o riscaldamento e con una “shelf-life” piuttosto lunga (superiore ai 30 giorni).

L. monocytogenes non è un buon competitore e nel suo sviluppo è quasi contrastata dalla proliferazione di una flora microbica non patogena. Se è mescolata ad altri microrganismi tipici dell'ambiente esterno, *L. monocytogenes* non moltiplica con facilità e stenta a raggiungere cariche molto elevate. Invece il batterio riesce a proliferare con notevole velocità quando si trova a essere l'unico componente della flora microbica di un alimento; però non è sempre

così, in alcuni episodi di listeriosi epidemica si è visto che il batterio si era moltiplicato anche in presenza di una flora microbica associata.

4.2 FORME CLINICHE DELLA LISTERIOSI

Oggi giorno, dopo notevoli studi in materia, sappiamo che non è più vero il concetto che *L. monocytogenes* sia un agente di malattia condizionato da uno stato di depressione del sistema immunitario dell'uomo. Il batterio può colpire anche le persone immunocompetenti. È vero, però, che il microrganismo manifesta una più maggiore virulenza soprattutto in soggetti che hanno difese immunitarie più o meno fortemente indebolite, perché sottoposti a terapie con corticosteroidi o farmaci immunosoppressivi, o anche perché affetti da patologie croniche quali epatopatie o diabete. Anche le donne in gravidanza rientrano in questa categoria “a rischio”.

Nei soggetti immunocompetenti la listeriosi può manifestarsi anche in forma subclinica, con sintomi oculari, cutanei, simil-influenzali o di gastroenterite. La diarrea, però, non è un sintomo proprio di tutti i casi di listeriosi e può essere specifica soltanto di alcuni ceppi di *L. monocytogenes* (Linnan *et al.*, 1988). Nei soggetti immunocompromessi, il batterio causa, in primo luogo, infezione intrauterina (per la donna in gravidanza), meningite e setticemia.

Alcuni autori inglesi, in base ai dati epidemiologici in loro possesso, hanno stimato che circa un terzo dei pazienti che sviluppano una meningite da listeria e il 10% di quelli colpiti da setticemia sono, in realtà, soggetti normalmente immunocompetenti (McLauchlin *et al.*, 2004). In una percentuale decisamente più bassa di casi, gli stessi pazienti immunocompetenti sviluppano meningoencefalite ed encefalite, associate a focolai di sepsi localizzati.

In circa il 5% dei casi, l'uomo contrae listeriosi non dagli alimenti inquinati, bensì per contatto con animali a loro volta affetti da listeriosi o con materiale organico che contiene alte cariche del batterio (es. ostetrici che effettuano secondamento di partorienti affette da listeriosi). In questi casi, sono segnalate anche forme di listeriosi cutanea e oculare, che sfociano spesso in forme cliniche generalizzate.

In gravidanza, *L. monocytogenes* può invadere l'utero e provocando al feto una grave infezione sistemica acuta mentre la madre presenta lievi sintomi simil influenzali. L'infezione può colpire la donna in gravidanza in qualsiasi momento della gestazione, con possibile morte del feto in utero e aborto.

Nella listeriosi "sistemica" i tassi di letalità possono arrivare fino a un massimo del 40-50% dei soggetti colpiti; tra coloro che sopravvivono, inoltre, le affezioni cerebrali possono residuare strascichi anche considerevoli.

In Italia Salamina e coll. (1996) hanno descritto uno dei più "tipici" episodi di gastroenterite da *L. monocytogenes* che abbiano colpito persone immunocompetenti. La malattia colpì un gruppo di 39, dopo una cena privata, tutte adulte ed immunocompetenti (nessuna donna in gravidanza). 18 di essi (46%) presentarono sintomi di malessere, per lo più di natura gastroenterica (il 78%) con un periodo di incubazione breve. 4 furono ricoverati in ospedale con gastroenterite acuta e febbre e da 2 di essi si riuscì a isolare *L. monocytogenes* dal sangue. Il batterio fu isolato dagli avanzi di un'insalata di riso, dal frigorifero di casa e da un frullatore; tutti i ceppi isolati erano del medesimo sierotipo (1/2b). questo caso ci fa capire che *L. monocytogenes* può colpire anche persone immunocompetenti. Secondo Vásquez-Boland e coll. (2001), il quadro clinico della listeriosi invasiva è caratterizzato

da aborto, setticemia e meningoencefalite, ma la malattia può manifestarsi anche con sintomi di gastroenterite febbrile. La forma invasiva è tipica dell'infezione della donna in gravidanza e dei soggetti immunocompromessi, mentre la forma gastroenterica tende a colpire con maggiore frequenza le persone immunocompetenti.

La listeriosi sistemica è una patologia per rara e dovuta alla presenza di poche listerie in un alimento, di rado comporta lo scatenarsi di simili sindromi morbose.

Le persone che hanno difese immunitarie molto indebolite perché hanno subito seri interventi chirurgici (trapianto o sostituzione di valvole cardiache) o perché sono affette da patologie croniche debilitanti, sono più a rischio che la listeriosi si manifesti in forma sistemica. In questi casi *L. monocytogenes* dimostra un particolare tropismo per il tessuto nervoso con importanti sintomi neurologici che possono assomigliare da vicino ai quadri clinici del botulismo e della *West Nile Encephalitis* (Jackson *et al.* 2003; Rettally e Speeg, 2003; Fernández Guerrero *et al.*, 2004; Mendez-Hernandez *et al.* 2004; Rohde *et al.* 2004; Cunha *et al.* 2004).

Se da un lato la listeriosi non porta a morte il soggetto può debilitare in maniera grave l'organismo dell'ospite, lasciando complicanze o strascichi che possono richiedere terapie riabilitative di mesi prima di essere risolte. In qualche caso la gravità della situazione è accentuata dal fatto che il ceppo di *L. monocytogenes* causa di malattia è anche resistente a uno o più antibiotici (Manfredi *et al.* 2003).

Anche abitudini di vita sregolate possono contribuire ad aggravare la sintomatologia di una listeriosi umana: alcolismo, tabagismo e carenze di vitamina A da non corretta alimentazione possono favorire una listeriosi sistemica di tipo neurologico (Débat Zoguereh *et al.* 2003).

Quasi sempre le forme neurologiche gravi di listeriosi colpiscono persone immunocompromesse, ma in letteratura medica sono segnalati casi di soggetti immunocompetenti che hanno comunque sviluppato forme cliniche gravi di listeriosi sistemica (Morosi e coll. 2005; Flodrops e coll. 2005; Smiatacz e coll. 2005). Probabilmente questi pazienti avevano mangiato cibi inquinati con cariche elevatissime di *L. monocytogenes*, ben superiori a 10^6 ufc/g.

I francesi Hugot e coll. (2004), infine, hanno preso in considerazione la possibilità che *L. monocytogenes*, come *Mycobacterium paratuberculosis*, possa essere causa (o quanto meno concausa) del morbo di Crohn.

LA LISTERIOSI NEGLI ANIMALI:

Le listerie dispongono di uno spettro di ospiti particolarmente ampio. Possono dunque essere infettati da *Listeria* i ruminanti, (soprattutto i bovini, ovini e caprini), più raramente gli equini, i suini, i conigli e gli uccelli. Tuttavia, sono state isolate delle listerie anche in pesci, anfibi, rettili e alcuni artropodi.

Oltre all'infezione asintomatica, appaiono tre forme cliniche principali: quella cerebrale, quella setticemica e quella metrogena.

Forma cerebrale: la listeriosi cerebrale è la forma più frequente negli ovini e nei bovini. Nella fase iniziale, la temperatura corporea aumenta con la febbre, più tardi appaiono depressione e disturbi della coordinazione motoria. Le deficienze del sistema nervoso centrale possono portare a paralisi delle orecchie, delle palpebre, delle sopracciglia o delle labbra. Ne conseguono anche difficoltà di deglutizione. Negli ovini si osservano inoltre infiammazioni delle congiuntive oculari (congiuntiviti).

Forma setticemica: l'infezione generalizzata dell'organismo da parte di *Listeria* (setticemia) colpisce soprattutto gli agnelli, infettati già nello

stadio intrauterino. I vitelli sono raramente colpiti e nei ruminanti adulti la malattia è eccezionale. Possono però ammalarsi di questa forma di listeriosi il pollame domestico e altre specie di uccelli.

Forma metrogena: appare sotto la forma di aborti, nascite premature o di vitelli deboli alla nascita.

I suini sono colpiti raramente da infezioni da *Listeria*. Sporadicamente sono stati riscontrati aborti causati da *Listeria* negli equini. I cani e i gatti se ne ammalano solo in casi eccezionali.

Il contagio avviene facilmente in quanto le *Listeria* sono presenti anche nell'intestino di animali clinicamente sani (portatori asintomatici) e giungono nell'ambiente mediante gli escrementi. Sopravvivono per settimane fino a mesi nel suolo e nelle piante. Quindi anche il foraggio insilato ha un ruolo di particolare rilievo nella trasmissione del batterio; se il pH dell'insilato è superiore a 5, a causa di un'insufficiente acidificazione, i batteri possono moltiplicarsi agevolmente e infettare l'animale al momento del consumo.

La priorità nella profilassi contro le *Listeria* consiste nell'igiene del foraggio. Per evitare quanto possibile il contagio dell'effettivo tramite il foraggio insilato, è d'obbligo un insilaggio ineccepibile.

La malattia presenta maggior rilievo negli ovini, caprini e bovini, ma è stata segnalata anche in altre specie di mammiferi, volatili, insetti, pesci e crostacei. Normalmente la malattia si presenta con tre forme: setticemica, nervosa e genitale (aborto).

Nelle volpi la listeriosi determina un'encefalite con sintomi che simulano la rabbia. Negli ovini la forma più frequente è l'encefalite, ma anche aborto e irite, spesso la morte sopravviene entro un giorno dall'inizio dei sintomi. Nei bovini la forma neurologica (con la comparsa di microascessi cerebrali) presenta un'evoluzione più cronica e gli animali sopravvivono sino a due settimane dall'inizio dei

sintomi. L'encefalite può colpire animali di ogni età ma prevale in quelli di meno di tre anni, anche se non compare prima dello svezzamento. Negli animali giovani l'infezione si presenta per lo più in forma setticemica (spesso letale) con la comparsa di focolai necrotici nel fegato e in altri organi addominali. Gli aborti invece colpiscono soprattutto a fine gestazione. Esistono altre forme più rare di listeriosi quali polmoniti, endocarditi, miocarditi. Nei bovini sono stati descritti anche casi di localizzazioni alla mammella con possibile eliminazione dell'agente eziologico attraverso il latte anche dopo l'avvenuta guarigione, rappresentando così un pericolo per la salute pubblica. Spesso l'infezione viene contratta a causa della presenza del microrganismo negli insilati usati per la loro alimentazione.

4.3 L'UOMO COME PORTATORE ASINTOMATICO DI

L. monocytogenes

Il personale addetto alla manipolazione degli alimenti può essere un portatore asintomatico di *L. monocytogenes* 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. Secondo Jensen (1993), invece, le persone immunocompetenti possono essere portatori asintomatici del batterio in percentuali comprese tra il 2% e il 6%. L'incidenza dei portatori cresce tra le persone colpite da forme di listeriosi sporadica (il 21% dei pazienti nei primi stadi di malattia può eliminare fino a 10.000 listerie/g 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. Il problema si può ridurre di molto applicando scrupolosamente le Good

Manufacturing Practices (buone prassi igieniche) in fase di lavorazione degli alimenti.

5 RUOLO DEI BOVINI NELLA CATENA ALIMENTARE

5.1 PORTATORI ASINTOMATICI A LIVELLO ENTERICO

I bovini vivi possono veicolare, nel loro intestino (pre stomaci compresi), un'ampia gamma di microrganismi potenzialmente pericolosi per la salute umana, a partire da *Salmonella enterica* e ceppi verocitotossici di *Escherichia coli*. Con le feci, questi microrganismi possono essere emessi all'esterno e in fase di macellazione possono in qualche modo inquinare le carcasse in approntamento.

Il prelievo delle feci per sottoporle ad analisi può essere eseguito con varie modalità. Negli animali vivi, si possono prelevare direttamente le feci appena deposte, a terra, oppure le stesse sono prelevate direttamente dal retto dell'animale con un'esplorazione rettale o altre strategie operative alternative (prelievo con tampone rettale).

In alternativa, il prelievo può essere condotto direttamente in fase di macellazione, subito dopo l'eviscerazione dell'animale, dal colon perché è questo il tratto intestinale che contiene la maggior parte della flora microbica intestinale che poi sarà emessa dall'animale all'esterno.

Nei bovini, può essere altresì significativo effettuare anche un prelievo di contenuto ruminale.

5.2 *L. MONOCYTOGENES* SULLA CUTE DEI BOVINI

Rivera-Betancourte e coll. (2004), in un'indagine condotta su animali direttamente al macello, hanno verificato la prevalenza di *L. monocytogenes* sulla loro cute. Su un totale di 1.033 capi testati, *L. monocytogenes* è stato isolata nel 9,9%, una prevalenza più bassa di quella riscontrata per *Salmonella enterica* ed *E. coli* O157 nell'ambito della stessa ricerca. Le indagini sono state condotte in due differenti impianti di macellazione evidenziando sensibili differenze di prevalenza tra i due impianti: 0,8% nel primo (situato nel sud del paese) e 18,7% in quello situato al nord del paese. Non si sono osservate variazioni significative in rapporto al cambiamento delle stagioni.

Guerini e coll. (2007) hanno riscontrato una prevalenza del 13,3% sulla cute di vacche e vitelloni da carne; hanno, inoltre, rilevato significative variazioni stagionali della prevalenza, con picchi in inverno e in primavera (19,1% e 23,2%, rispettivamente) e cali in estate e autunno (5,8% e 5,3%, rispettivamente).

Invece si pensa, di solito, che la prevalenza di *L. monocytogenes* sulla cute degli animali portati a macello sia maggiore nei periodi caldi dell'anno.

Probabilmente però le basse temperature esterne favoriscono la persistenza di *L. monocytogenes* nel contesto di una microflora presente sulla cute degli animali, fatto che invece non avviene nei periodi più caldi dell'anno, dove le altre specie batteriche prendono facilmente il sopravvento e possono in qualche modo frenare o inibire la proliferazione e/o la persistenza di *L. monocytogenes* .

6 NOZIONI DEL PACCHETTO IGIENE

Il pacchetto igiene è costituito da una serie di Regolamenti comunitari e da regolamenti che integrano o modificano i precedenti.

Si possono riassumere, molto brevemente, così:

- Reg. CE 852/2004, riguarda l'igiene dei prodotti alimentari ed è destinato all'OSA
- Reg. CE 853/2004, stabilisce e descrive in modo più dettagliato della 852 le norme concernenti l'igiene dei prodotti di origine animale. Anche questo regolamento è destinato all'OSA.
- Reg. CE 854/2004, disciplina i comportamenti delle Autorità sanitarie in ambito di macelli e produzione di prodotti alimentari di origine animale. È il corrispettivo del reg. 853 ma in questo caso è indirizzato alle Autorità sanitarie.
- Reg. CE 882/2004, detta le norme specifiche per le Autorità sanitarie di controllo; regolamentando il loro comportamento ed il loro operato nell'ambito della sanità pubblica.
- Dir. 2002/99/CE, sono le norme di polizia sanitaria inerenti la produzione, la trasformazione, la distribuzione e l'importazione di prodotti di origine animale destinati al consumo umano.

D.M. 15/12/1990, stabilisce l'obbligatorietà della notifica per i casi di misteriosi ma non prevede l'invio dei ceppi isolati da campioni clinici ad un laboratorio per la tipizzazione sierologica e molecolare. Pertanto nel data-base del Ministero della Salute sono solo presenti dati epidemiologici (età, sesso, distribuzione geografica). Recentemente l'ECDC per le *Food- and Waterborne Diseases* ha previsto la raccolta non solo di dati epidemiologici ma anche microbiologici (sierotipo, pulsotipo), nonché l'esito della malattia.

Decreto Legislativo n. 191 del 4 aprile 2006 "Attuazione della direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici" inserisce la listeriosi fra gli agenti zoonotici da sottoporre a sorveglianza.

Reg. CE 2073:2005 e la sua successiva integrazione (Regolamento CE 1441:2007) hanno stabilito i criteri microbiologici per *Listeria monocytogenes* in alimenti pronti per il consumo. In base ad un'analisi del rischio il limite stabilito nei Regolamenti CE per *L. monocytogenes* per alcune categorie di alimenti è di 100 ufc/g, limite che deve essere rispettato per tutta la durata commerciale del prodotto. A tale scopo la Commissione Europea, ha emesso una linea guida e un documento tecnico destinato agli operatori del settore alimentare per condurre studi di *shelf-life*.

Le misure di controllo dovrebbero essere indirizzate a livello di allevamenti e impianti di produzione alimentari al fine di prevenire la contaminazione dei prodotti alimentari.

Le misure preventive includono appropriate informazioni ai consumatori su come minimizzare il rischio di ingerire alimenti contaminati

Alcune definizioni del Regolamento CE 2073/2005:

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

Criterio microbiologico: è un criterio che definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base alla presenza o meno e quindi al numero del 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 partita di esso quando il suo destino è la sua immissione sul mercato.

Criterio di igiene di processo (CIP): definisce il funzionamento accettabile del processo di produzione. Fissa un valore indicativo di contaminazione al di sopra del quale sono necessarie misure correttive volte a mantenere l'igiene del processo di produzione .

Conservabilità: 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 necessaria ulteriore cottura o altro trattamento per eliminare o ridurre i microrganismi presenti

Capitolo II

MATERIALI E METODI

1. OBIETTIVO DELLA TESI

L'obiettivo della mia tesi è quello di ottenere dati attuali sulla prevalenza in Italia di *L. monocytogenes* nell'intestino di bovini macellati regolarmente. Lo scopo è di capire il ruolo che i soggetti portatori asintomatici possono avere durante la filiera produttiva, in modo da fornire indicazioni importanti per la valutazione del rischio potenziale della carne bovina sulla salute dei consumatori.

Innumerevoli studi hanno confermato che i portatori asintomatici per altri microrganismi patogeni quali *E. coli* e *Salmonella* spp sono causa di malattia alimentare, ma per quanto concerne *L. monocytogenes* non si conosce ancora bene il ruolo e la stima di questi portatori asintomatici soprattutto al macello. Inoltre le fasi di macellazione in particolare l'eviscerazione, può essere fonte di contaminazione diretta per la carcassa da lì discendere poi lungo la filiera produttiva fino al consumatore causando malattia alimentare.

I dati ottenuti con questa ricerca sono i primi a livello italiano. Infatti la bibliografia esistente prende in considerazione animali con listeriosi clinicamente manifesta ed il numero degli animali testati è abbastanza esiguo, si parla di 400-500 bovini testati fino adesso, mentre in questa tesi sono testati più di 1000 capi.

2. TECNICHE ANALITICHE

2.1 METODICHE DI CAMPIONAMENTO

La ricerca è stata svolta in due macelli riconosciuti CE, dove è stato effettuato il prelevamento di contenuto intestinale direttamente dal colon di vitelli (198-242 giorni), vitelloni/bovini adulti (410-708 giorni), vacche a fine carriera, appena macellati e provenienti da diverse aziende. La ricerca di *Listeria monocytogenes* è stata condotta con metodica ISO11290-1.

I campioni sono stati sottoposti ad analisi per la ricerca di *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*.

In totale sono stati sottoposti al controllo 1.098 bovini da macello, divisi per categorie:

- vitelloni: 512
- Vacche: 314
- Vitelli: 272

I macelli presi in considerazione costituiscono un ottimo osservatorio epidemiologico per questo tipo di indagini, dato che in uno sono destinati i bovini allevati un po' dal tutto il Piemonte e anche da regioni limitrofe; mentre nell'altro vengono convogliati i bovini della bassa padovana. Come tali, i due impianti permettono di confrontare anche due differenti geografie produttive.

La ripartizione dei prelievi per singole categorie di bovini non è stata casuale: si è cercato di rispettare nei prelievi una certa proporzionalità tra bovini, privilegiando così i vitelloni da carne, ma prelevando un consistente numero di campioni anche dalle vacche a fine carriera che, si presuppone, siano un buon indice delle condizioni che si hanno negli allevamenti da latte.

Anche il numero di vitelli, è consistente, per il ruolo che hanno questi animali come fornitori di carni di alto pregio per il consumatore.

Per ogni capo macellato, al momento del prelievo è avvenuta la registrazione del numero di passaporto, desumendolo dai registri di rintracciabilità del macello stesso.

Il prelievo del contenuto intestinale è stato effettuato direttamente dal colon di ciascun animale, con uso di materiale sterile per prelievo. Per ogni capo si prelevavano circa 250 g di feci.

2.2 ANALISI MICROBIOLOGICHE

I campioni sono stati registrati per categoria, provenienza, età, data di macellazione. Inoltre, per i campioni positivi, sono stati registrati ulteriori dati riguardanti la marca auricolare e la partita capo.

La ricerca si è basata sulla seguente metodica:

- fase di pre-arricchimento : 25 g di campione sono stati omogeneizzati in 225 ml di *Listeria Enrichment Broth* (UVM), un brodo d'arricchimento, e posti in un contenitore sterile, opportunamente siglato con il numero del campione.
- Dopo 24 ore d'incubazione a 31°C, 1 ml di coltura è stato inoculato, tramite l'utilizzo di pipettatrici e puntali sterili, in 10 ml di un secondo brodo selettivo e di arricchimento, *Fraser Broth*, il tutto posto all'interno di provette sterili (fase di pre-arricchimento selettivo). La presenza di *Listeria* in questo brodo è indicato dall'annerimento della coltura, dovuto alla reazione della esculetina, prodotta dall'idrolisi dell'esculina, con gli ioni ferro.
- Le suddette provette sono state poste ad incubare per 24 ore alla temperatura di 37 °C. Da questa brodocoltura e con l'utilizzo di un'ansa sterile è stata effettuata la semina su un terreno di base per l'isolamento di *Listeria*, selettivo e differenziale chiamato *Palcam*

Agar Base (ISO 11290). Il terreno utilizza un doppio sistema indicatore: idrolisi dell'esculina e fermentazione del mannitolo. *Listeria* spp. idrolizza l'esculina e non fermenta il mannitolo, producendo colonie circondate da un alone nero.

- Le piastre così ottenute, sono state poste ad incubare per 24/48 ore ad una temperatura di 37 °C.
- Le colonie sospette, sono state sottoposte ad identificazione in base alle caratteristiche morfologiche e tintoriali tramite la colorazione di Gram: *Listeria* è un bastoncino Gram positivo, si colora quindi di viola; Figure dalla n°1 alla n°5: colorazione Gram di colonie ottenute dai campioni e fotografate con un microscopio Leica DM 5000 (Leica, BM Medical, Padua Italy), ingrandimento 100x ad immersione ad olio e contrasto di fase.
- Le colonie sono state poi riseminate in terreni di mantenimento quali PCA e KLIGLER.

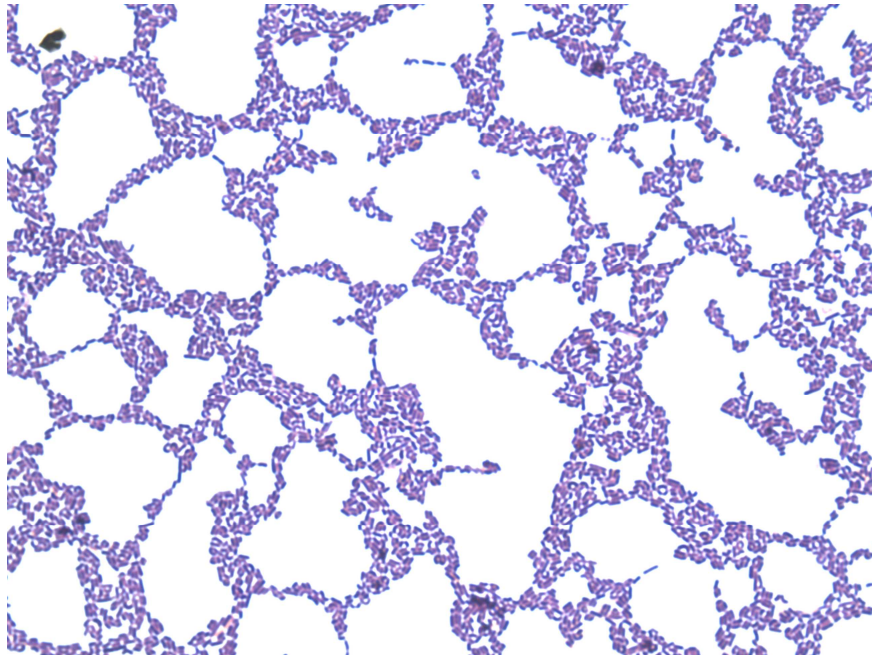


Figura n°1 colorazione Gram: bastoncini viola; probabile *Listeria*.

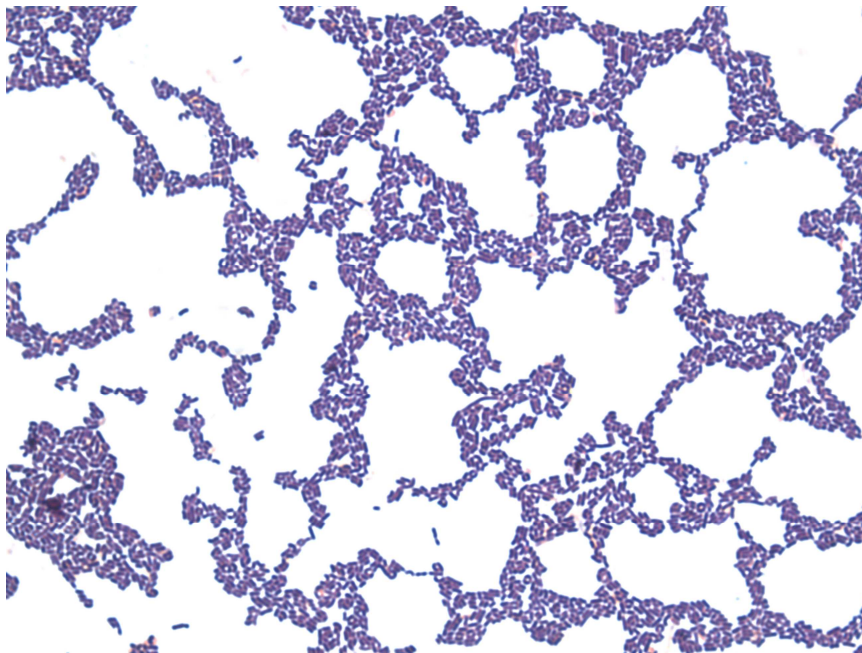


Figura n°2 colorazione Gram.

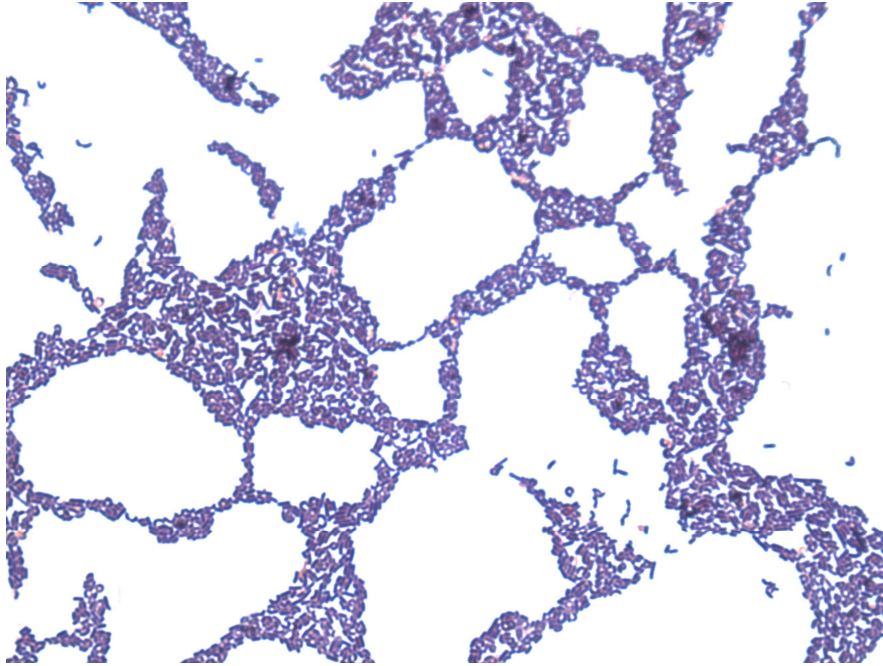


Figura n°3 colorazione Gram: bastoncini viola.

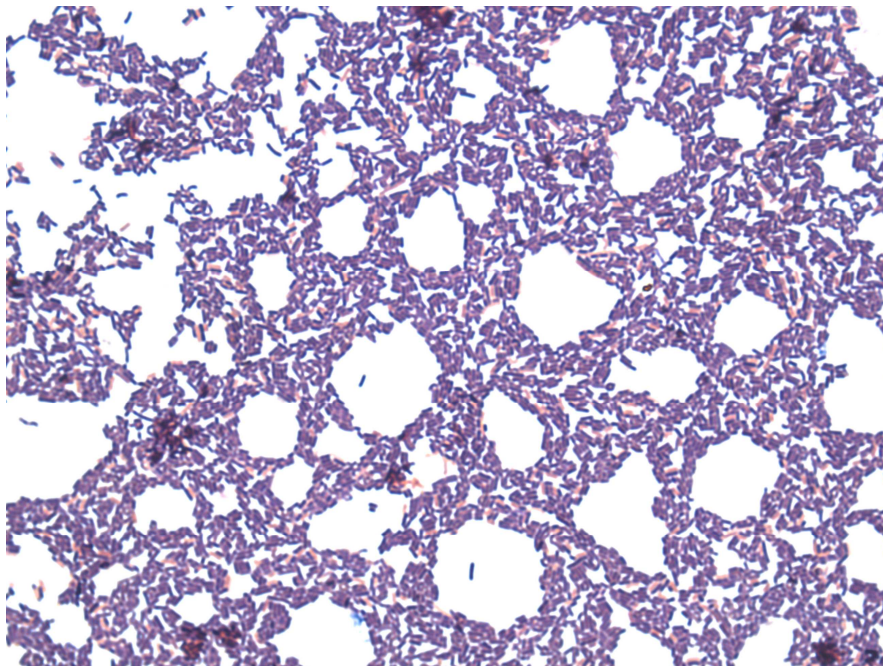


Figura n°4 colorazione Gram: bastoncini viola

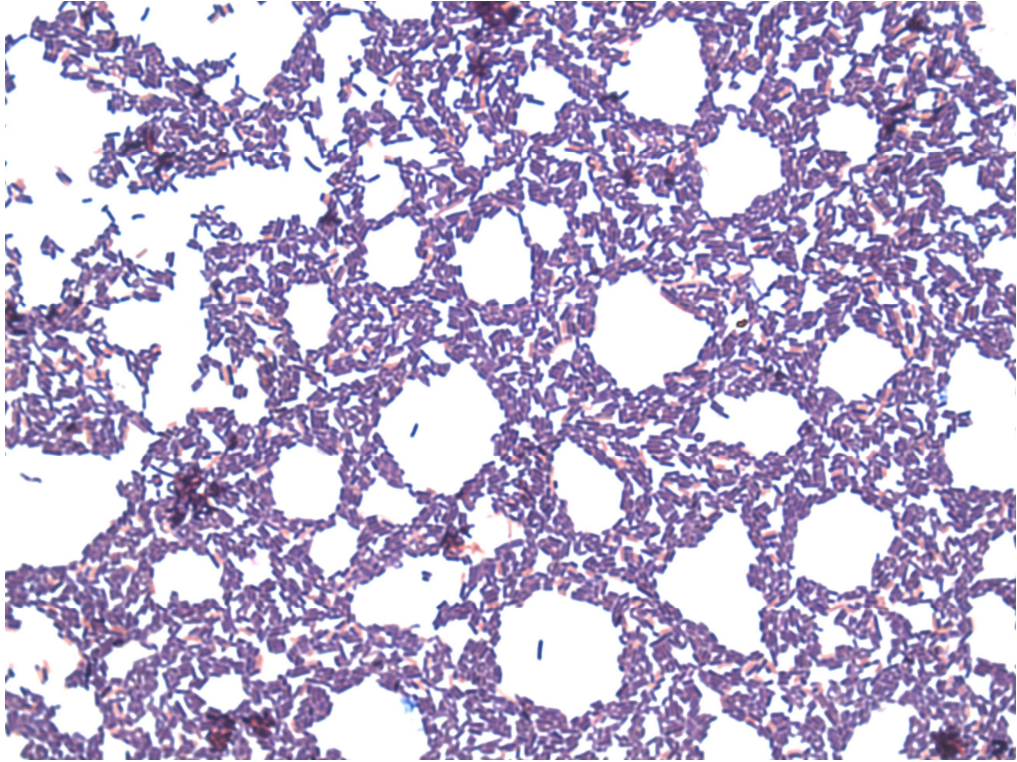


Figura n°5 colorazione di Gram: bastoncelli viola.

- L'identificazione biochimica è stata effettuata mediante gallerie API *Listeria*. Queste gallerie sono costituite da 10 microprovette contenenti substrati disidratati, per la ricerca delle attività enzimatiche e fermentative degli zuccheri. La reazione prodotta durante l'incubazione si traduce in viraggio cromatico spontaneo, o rilevato dopo aggiunta di reattivi ausiliari.
- Inoltre per i ceppi di *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* sono state eseguite prove di antibiotico resistenza, testando 16 antibiotici.

Nello specifico, i vari terreni e brodi sono stati ottenuti nel seguente modo.

- 1 *Listeria Enrichment Broth* (UVM): introdurre 54,4 grammi per 1 litro di acquadistillata in una beuta e autoclavare per 15 minuti ad una temperatura di 121°C.
- 2 *Fraser Broth*: sospendere 55 grammi di polvere in 1 litro di acqua distillata, scaldare fino alla completa dissoluzione. Sterilizzare in autoclave per 15 minuti ad una temperatura di 121 °C. Lasciare raffreddare a 50°C ed aggiungere le fiale di *Listeria supplement Fraser* e di citrato d'ammonio. Miscelare bene e distribuire 10 ml di questo brodo in provette sterili.

Listeria Fraser Broth è un raccomandato per il secondo arricchimento di *Listeria* in alimenti e campioni di origine animale. Il terreno contiene degli agenti selettivi l'acriflavina, un derivato acridinico con proprietà batteriostatiche nei confronti dei batteri Gram-positivi e l'acido nalidixico, un inibitore dei batteri Gram-positivi.

La presenza di *Listeria* nel *Listeria Fraser Broth* è indicata dall'annerimento della brodocoltura dovuto alla reazione dell'esculetina, prodotta dall'idrolisi dell'esculina, con gli ioni ferro (figura n°6).

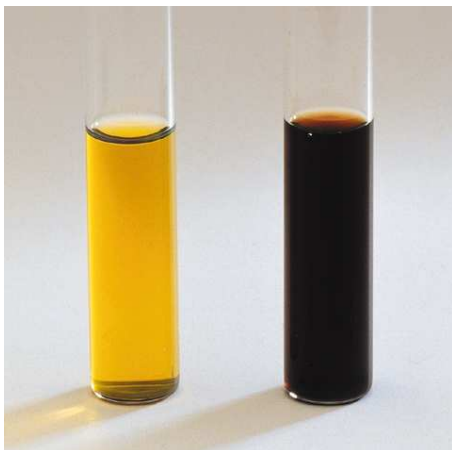


Figura n°6: annerimento della brodocoltura

- *Palcam Agar Base*: Sospendere 35,9 grammi di polvere in 500 ml di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione, autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C ed aggiungere, con le precauzioni dell'asepsi, il contenuto di 1 fiala di *PALCAM Antimicrobial Supplement*, ricostituito con 1 ml di acqua distillata sterile. Sotto cappa preparare le piastre con circa 15 ml di terreno per piastra.

Il terreno *PALCAM* è indicato per l'isolamento di *Listeria* spp. nei prodotti alimentari dai metodi ISO 11290 ed in microbiologia clinica quando sia necessario l'isolamento di *Listeria* spp. da campioni con flora saprofita. Il terreno di base ed il supplemento selettivo sono stati preparati in accordo alla formulazione descritta da Van Netten e coll. Il terreno "*PALCAM* consente l'isolamento ed una preliminare differenziazione di *Listeria* spp. La selettività è dovuta alla presenza nel terreno di base del litio cloruro e di polimixina B, ceftazidime ed

acriflavina nel supplemento liofilizzato. Il terreno utilizza un doppio sistema indicatore: idrolisi dell'esculina e fermentazione de forma colonie circondate da un alone nero (a pedina di damma, figura n°7). Sul terreno non è possibile differenziare *L.monocytogenes* dalle altre specie del genere *Listeria*.

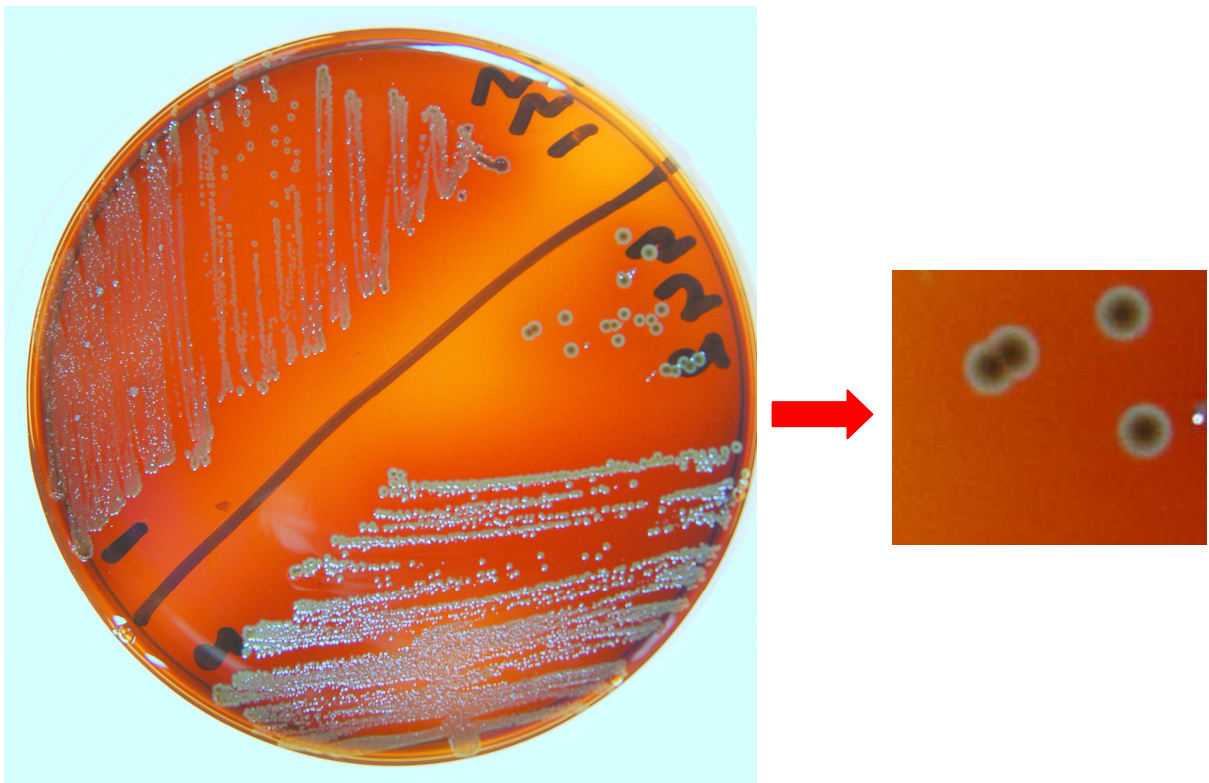


Figura n°7: *L. monocytogenes* in piastra e particolare di un ingradimento (colonie a pedina di dama) (Radu I.)

2.3 Biochimico: *API LISTERIA*

IL TEST *api Listeria* è un sistema standardizzato di identificazione delle varie specie di questo genere.

Il test è costituito da una galleria con 10 microprovette contenenti dei substrati disidratati per la ricerca delle attività enzimatiche e fermentative degli zuccheri.

- Dopo l'esecuzione della colorazione di Gram e avendo avuto il risultato desiderato, (bastoncini Gram positivi), si passa alla costituzione della sospensione dell'inoculo.
- Servendosi di un'ansa si preleva una colonia batterica dal terreno, e si sospende all'interno di una fiala *API Suspension Medium*, fino ad ottenere una sospensione di torpidità equivalente ad 1 della scala di *McFarland*.
- Si passa all'inoculo della galleria. Distribuire la sospensione batterica nelle microprovette evitando la formazione di bolle. Importante è la quantità e alla qualità di riempimento di ciascuna microprovetta. Leggere bene il foglio illustrativo.
- Porre ad incubare il tutto a 37 °C per 24 ore.
- Dopo questo periodo (meglio fare una lettura precedente a 12 ore d'incubazione) si fa la lettura della galleria. La lettura avviene tramite un viraggio di colore (figura n°8a, n°8b) e la corrispondente positività o negatività si evidenzia in una tabella.

Esempio: nel caso della microprovetta ESC, in cui avviene l'idrolisi dell'esculina, se il colore è giallo chiaro il risultato è positivo (+), in caso di colorazione nera il risultato è negativo (-).

L'identificazione avviene tramite un profilo numerico.

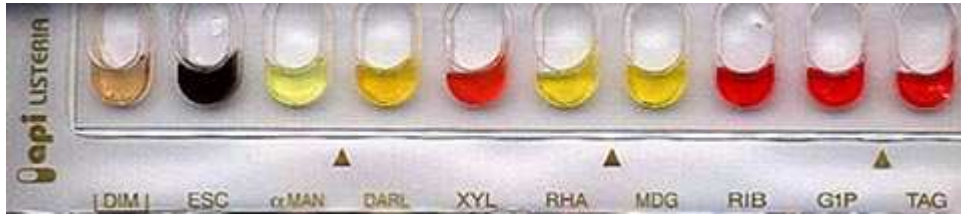


Figura n°8a



Figura n°8b

2.4 L'ANTIBIOGRAMMA

L'isolamento di ceppi di *Listeria* spp è stato poi completato da prove di antibiotico-resistenza sui ceppi di *Listeria* spp. che potevano risultare più pericolosi per l'uomo, vale a dire 17 ceppi di *L. monocytogenes* e 3 di *L. ivanovii*.

Gli antibiotici verso i quali è stata valutata la sensibilità o la resistenza dei ceppi sopra indicati sono stati, complessivamente, i sedici qui di seguito elencati (Tabella n°3).

Tabella n°3: nome, sigla e mcg usati dell'antibiotico.

ANTIBIOTICO	SIGLA	mcg
COLISTINA	CL	10
SULFAMIDICI+TRIMETHOPRIM	SXT	25+75
KANAMICINA	K	30
GENTAMICINA	GN	10
NEOMICINA	N	30
CEFOTASSINA	CTX	30
AMOXICILLINA+ACIDO CLAVULANICO	AMC	20+10
ACIDO NALIDIXICO	NA	30
TETRACICLINA	TE	30
AMPICILLINA	AM	10
STREPTOMICINA	S	10
TRIPLO SULFAMIDICO	SSS	25
CLORAMFENICOLO	C	30
CEFALOTINA	CF	30
ENROFLOXACIN	ENO	5
CIPROFLOXACIN	CF	5

Per le prove è stato utilizzato il **Metodo per diffusione** consistente in una prova di sensibilità di un microrganismo verso numerosi antibiotici su piastre di terreno solido mediante applicazione di antibiotici su terreno solido inoculato con il microrganismo da esaminare.

Il terreno usato è il **Mueller - Hinton agar** contenente:

- Estratto di carne
- Idrolisato acido di caseina
- Amido solubile
- Agar

Il pH finale risulterà $7,3 \pm 0,2$; è molto importante ricordare che il terreno deve essere omogeneo, in modo che i vari antibiotici possano diffondere con la stessa velocità.

Il **Mueller - Hinton agar** rappresenta un terreno in grado di soddisfare le più comuni esigenze nutrizionali dei più comuni batteri di interesse medico.

Per l'esecuzione dell'antibiogramma, secondo il metodo di **Bauer e Kirby**, si usa il Mueller - Hinton Agar in piastre da 12cm * 12cm. Per preparare l'inoculo si sospendono 2 colonie ottenute tramite la semina di una colonia originaria di listeria in un terreno base come il PCA. Dopodichè si procede alla costituzione della sospensione tramite l'utilizzo di acqua fisiologica sterile e la sospensione in questa delle colonie fino ad ottenere una opacità corrispondente a **0,5 McFarland, ovvero $1,5 \times 10^6$ batteri**). A questo punto si deve:

1. **Seminare** il batterio di cui si deve saggiare la sensibilità sulla superficie dell'agar
2. **Depositare** i dischetti di antibiotici sul terreno (alla giusta distanza) di coltura utilizzando pinzette sterili
3. Far **aderire** il dischetto al terreno

4. **Incubare** in termostato a 37 °C per 24 ore
5. Procedere alla **lettura** della grandezza degli aloni di inibizione.



Figura n°9 metodo per diffusione. Piastra pronta per la lettura del diametro degli aloni di inibizione. (Radu I.)

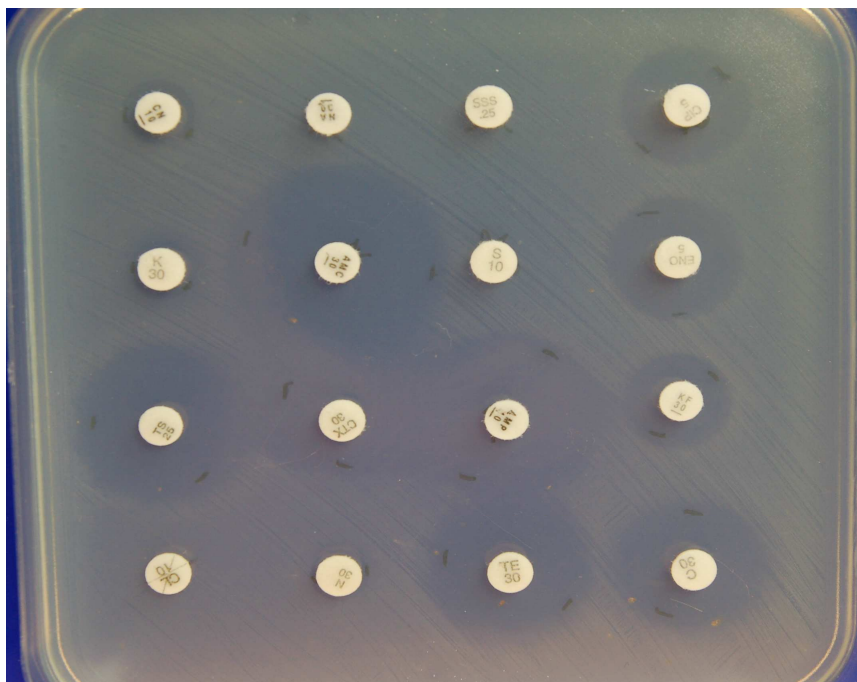


Figura n°10 metodo per diffusione. Piastra pronta per la lettura del diametro degli aloni di inibizione. (Radu I.)

Lettura dei valori e considerazioni

In base alle dimensioni degli aloni di inibizione della crescita nei confronti dei diversi principi attivi antibatterici, la reazione degli ceppi testati è stata valutata come: Sensibile, Intermedia, Resistente.

La lettura è stata eseguita seguendo le linee guida stabiliti dal *National Committee for Clinica e Laboratory Standards* (NCCLS) (tabella n°4).

Tabella n°4 Valori di riferimento (espressi in mm) per le sostanze antibatteriche utilizzate.

ANTIBATTERICO	RESISTENTE (R)	INTERME DIA (I)	SENSIBILE (S)
1. colistina	≤ 8	9-10	≥11
2. sulfamidici + trimethoprim	≤10	11-15	≥16
3. kanamicina	≤14	15-15	≥17
4. gentamicina	≤12	13-14	≥15
5. neomicina	≤12	13-16	≥17
6. cefotassina	≤14	15-22	≥23
7. amoxicillina+ acido clavulanico	≤13	14-17	≥18
8. acido nalidixico	≤13	14-18	≥19
9. tetraciclina	≤14	15-18	≥19
10. ampicillina	≤13	14-16	≥17
11. streptomina	≤11	12-14	≥15
12. triplo sulfamidico	≤12	13-16	≥17
13. cloramfenico	≤12	13-17	≥18
14. cefalotina	≤15	16-20	≥21
15. enrofloxacin	≤17	18-21	≥22
16. ciprofloxacina	≤17	18-21	≥22

CAPITOLO III

RISULTATI

1. RISULTATI PER LA PREVALENZA DI *Listeria monocytogenes* NEL CONTENUTO INTESTINALE DEI BOVINI REGOLARMENTE MACELLATI

Ho riportato i risultati ottenuti in tabelle e /o grafici che prenderò in considerazione nelle pagine successive.

Su un totale complessivo di 1.098 bovini da macello sottoposti a controllo, i positivi per *Listeria* spp. sono risultati 98 (8,92%), così ripartiti per categorie di animali:

- Vitelloni: 46 positivi su 512 capi esaminati (8,98%)
- Vacche: 33 positivi su 314 capi esaminati (10,5%)
- Vitelli: 19 positivi su 272 capi esaminati (6,98%)

Tabella n°5 ripartizione per specie e per categorie di animali dei ceppi di *Listeria* isolati.

Specie di <i>Listeria</i>	Totale ceppi	Vacche	Vitelloni	Vitelli
<i>Listeria monocytogenes</i>	33	6	16	11
<i>Listeria innocua</i>	17	7	7	3
<i>Listeria grayi</i>	17	8	9	0
<i>Listeria ivanovii</i>	6	1	5	0
<i>Listeria welshimeri</i>	24	10	9	5
<i>Listeria seeligeri</i>	1	1	0	0
Totale ceppi	98	33	46	19

La specie maggiormente rappresentata, nei campioni analizzati, è risultata comunque *L. monocytogenes*, seguita da *L. welshimeri*; a seguire vengono, con pari prevalenze, *L. innocua* e *L. grayi*, mentre sono assai poco rappresentate *L. ivanovii* e *L. seeligeri*.

1.1 GRAFICI

- I risultati sinora illustrati sono resi più comprensibili con un'elaborazione grafica (vedi Grafici dal n°1 al n°18).
- Ho effettuato un'ulteriore elaborazione grafica della stagionalità delle positività divisa per categoria di animale (vedi Grafici dal n°19 al n°24).

ANIMALI TESTATI DIVISI PER CATEGORIE	
NUMERO COMPLESSIVO ANIMALI TESTATI	1098
NUMERO COMPLESSIVO VACCHE	314
NUMERO COMPLESSIVO VITELLONI	512
NUMERO COMPLESSIVO VITELLI	272

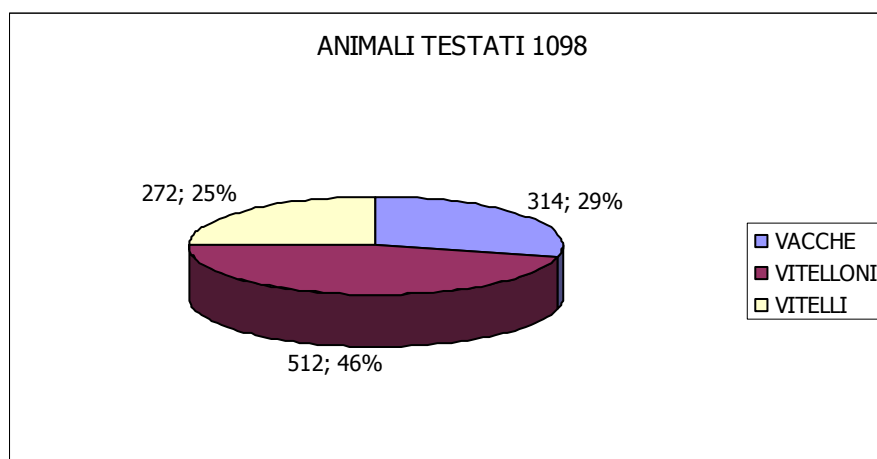


Grafico n°1

ANIMALI POSITIVI DIVISI PER CATEGORIE	
ANIMALI POSITIVI	98
VACCHE	33
VITELLONI	46
VITELLI	19

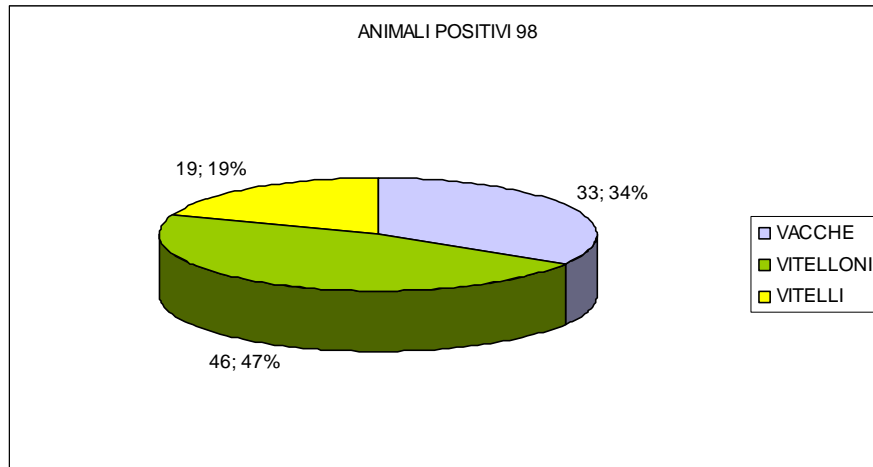


Grafico n°2

ANIMALI POSITIVI RISPETTO AL TOTALE DEGLI ANIMALI TESTATI	
NUMERO COMPLESSIVO ANIMALI TESTATI	1098
NUMERO COMPLESSIVO ANIMALI POSITIVI	98



Grafico n°3

VACCHE POSITIVE RISPETTO AL TOTALE DELLE VACCHE TESTATE	
NUMERO COMPLESSIVO VACCHE TESTATE	314
NUMERO COMPLESSIVO VACCHE POSITIVE	33

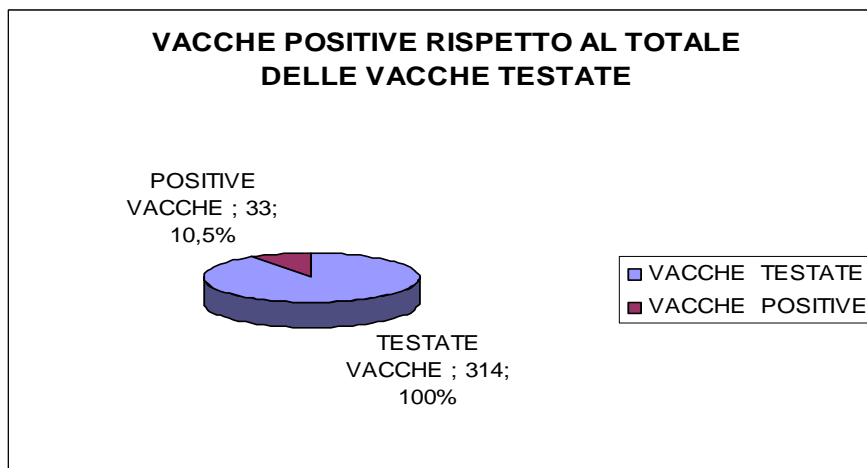


Grafico n°4

VITELLONI POSITIVI RISPETTO AL TOTALE DEI VITELLONI TESTATI		
NUMERO COMPLESSIVO TESTATI	VITELLONI	512
NUMERO POSITIVI	VITELLONI	46

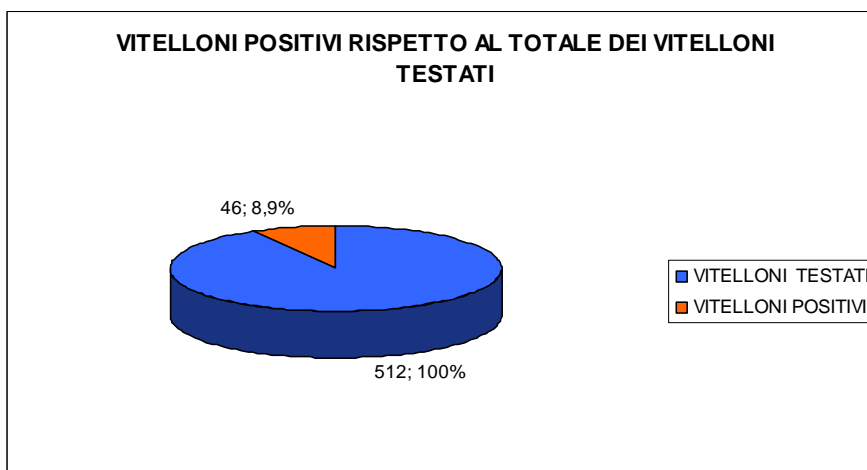


Grafico n°5

VITELLI POSITIVI RISPETTO AL TOTALE DEI VITELLI TESTATI	
NUMERO COMPLESSIVO VITELLI TESTATI	272
NUMERO COMPLESSIVO VITELLI POSITIVI	19

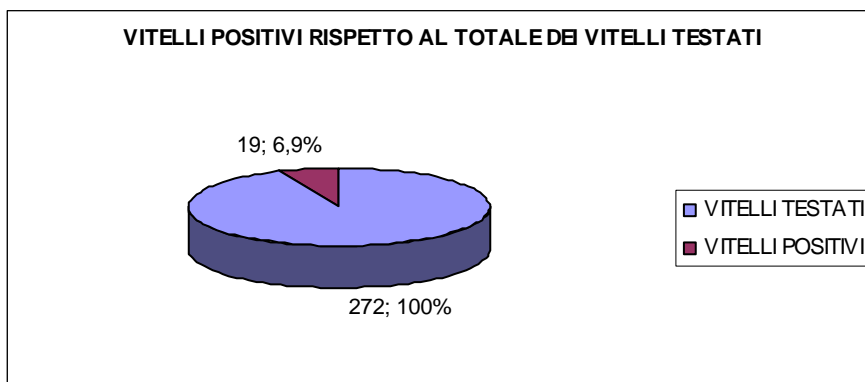


Grafico n°6

CEPPI ISOLATI DI LISTERIA	
SPECIE	NUMERO
TOTALE LISTERIE	98
<i>L. monocytogenes</i>	33
<i>L. innocua</i>	17
<i>L. grayi</i>	17
<i>L. ivanovii</i>	6
<i>L. welshimeri</i>	24
<i>L. seeligeri</i>	1

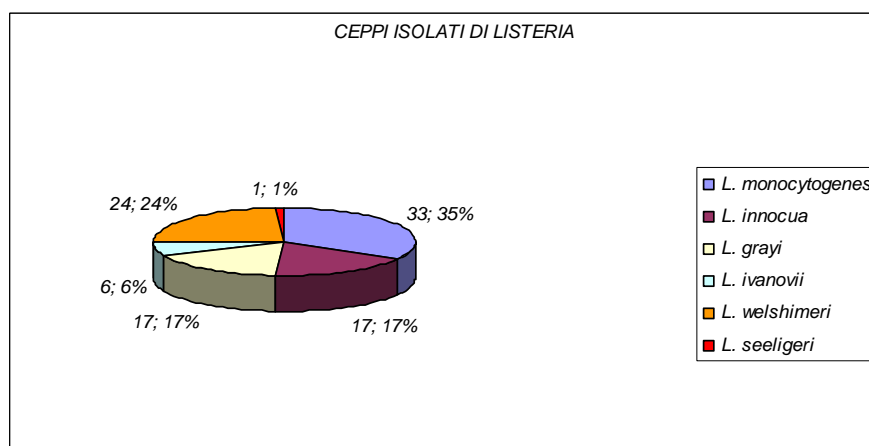


Grafico n°7

CEPPI DI <i>L. monocytogenes</i> RISPETTO AL TOTALE DEI CEPPI ISOLATI	
TOTALE CEPPI <i>Listeria</i>	98
TOTALE CEPPI <i>L. monocytogenes</i>	33

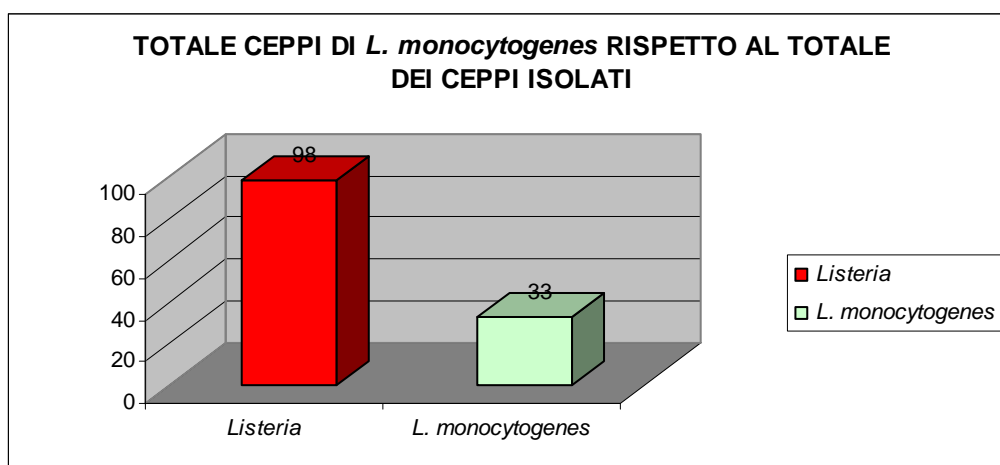


Grafico n°8

CEPPI DI <i>L. innocua</i> RISPETTO AL TOTALE DEI CEPPI ISOLATI	
TOTALE CEPPI <i>Listeria</i>	98
TOTALE CEPPI <i>L. innocua</i>	17

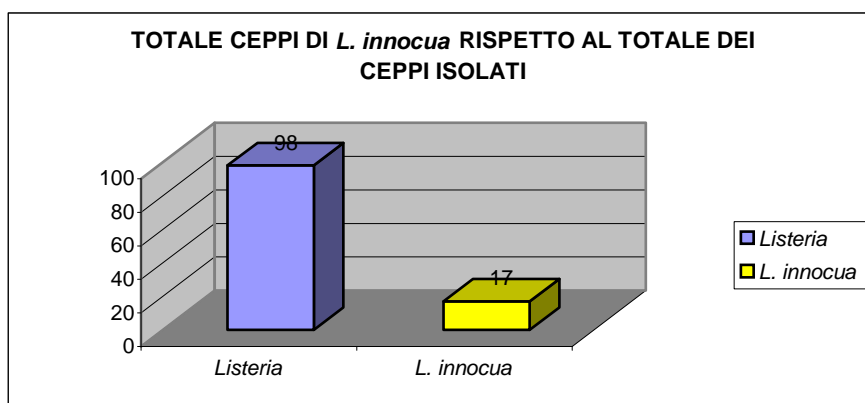


Grafico n°9

CEPPI DI <i>L. grayi</i> RISPETTO AL TOTALE DEI CEPPI ISOLATI	
TOTALE CEPPI <i>Listeria</i>	98
TOTALE CEPPI <i>L. grayi</i>	17

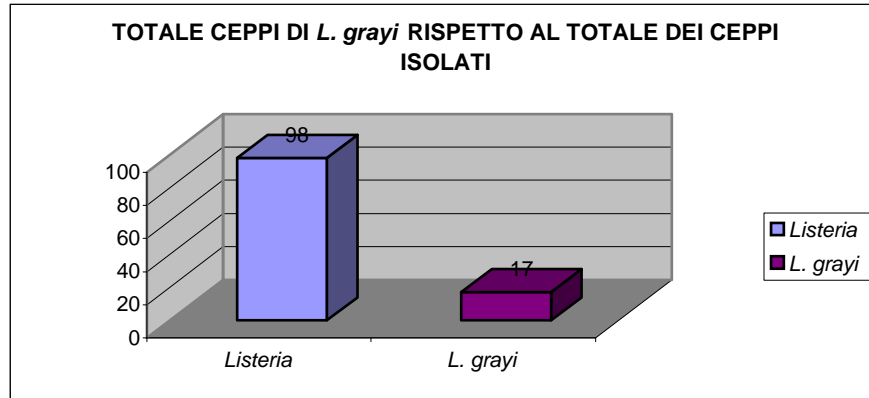


Grafico n°10

CEPPI DI <i>L. ivanovii</i> RISPETTO AL TOTALE DEI CEPPI ISOLATI	
TOTALE CEPPI <i>Listeria</i>	98
TOTALE CEPPI <i>L. ivanovii</i>	6

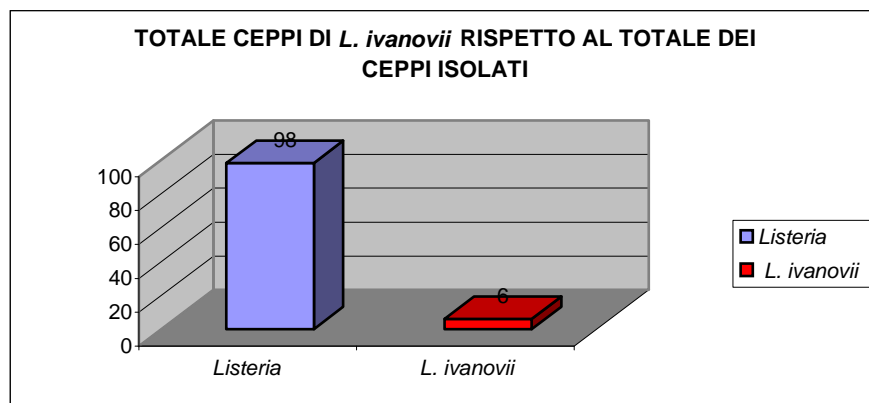


Grafico n°11

CEPPI DI <i>L. welshimeri</i> RISPETTO AL TOTALE DEI CEPPI ISOLATI	
TOTALE CEPPI <i>Listeria</i>	98
TOTALE CEPPI <i>L. welshimeri</i>	24

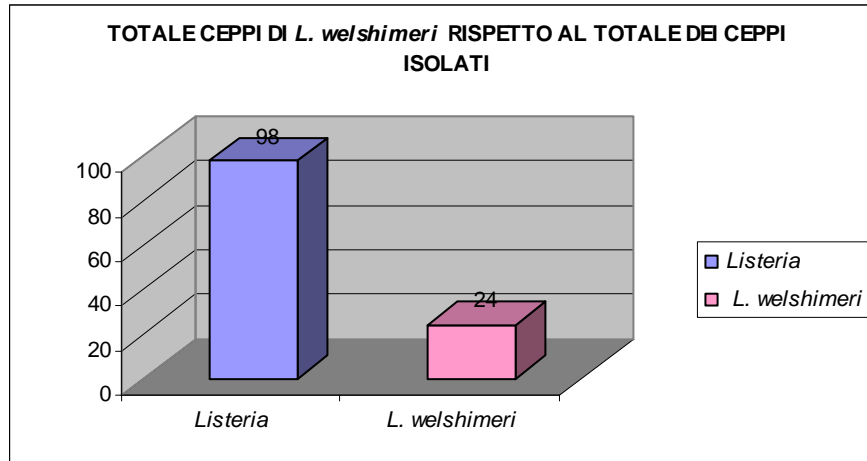


Grafico n°12

CEPPI DI <i>L. seeligeri</i> RISPETTO AL TOTALE DEI CEPPI ISOLATI	
TOTALE CEPPI <i>Listeria</i>	98
TOTALE CEPPI <i>L. seeligeri</i>	1

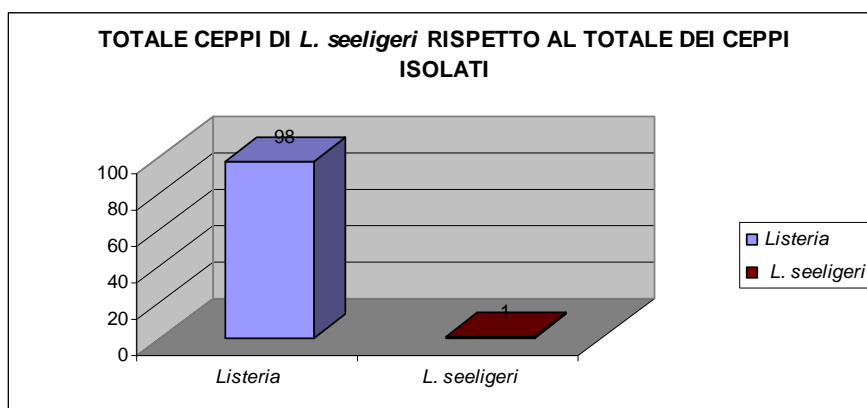


Grafico n°13

<i>L. monocytogenes</i> RICONTRATA NELLE VARIE CATEGORIE DI ANIMALI	
TOTALE	33
VACCHE	6
VITELLONI	16
VITELLI	11

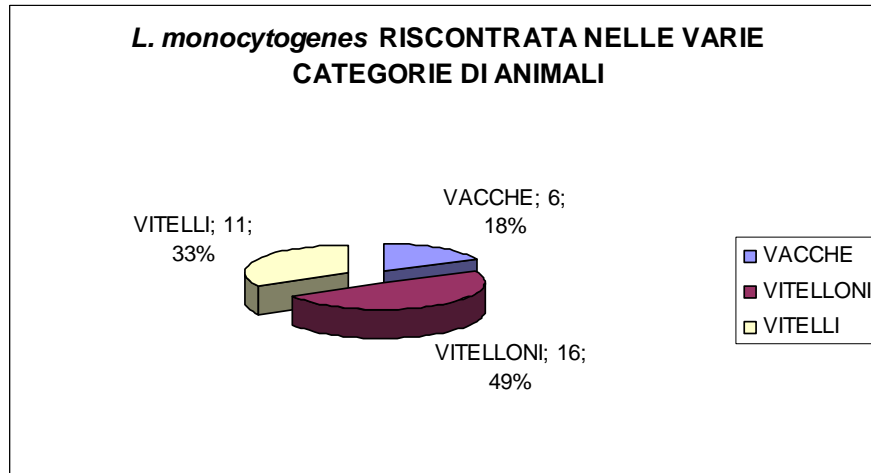


Grafico n°14

<i>L. innocua</i> RICONTRATA NELLE VARIE CATEGORIE DI ANIMALI	
TOTALE	17
VACCHE	7
VITELLONI	7
VITELLI	3

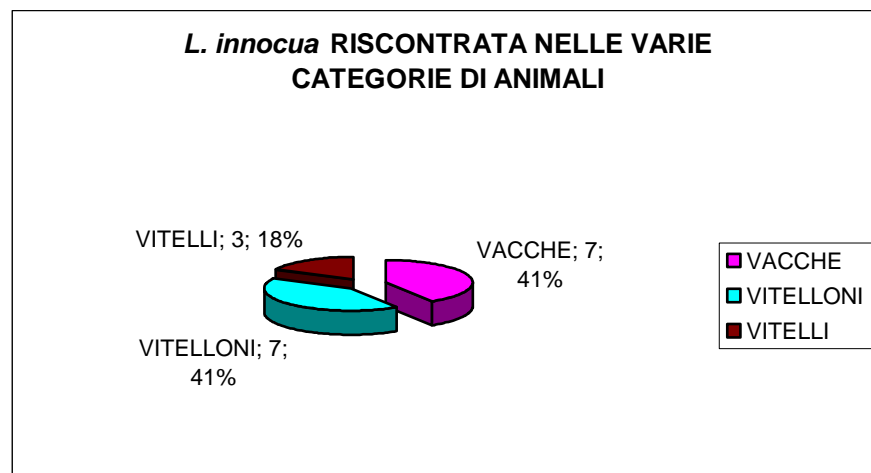


Grafico n°15

<i>L. ivanovii</i> RICONTRATA NELLE VARIE CATEGORIE DI ANIMALI	
TOTALE	6
VACCHE	1
VITELLONI	5
VITELLI	0

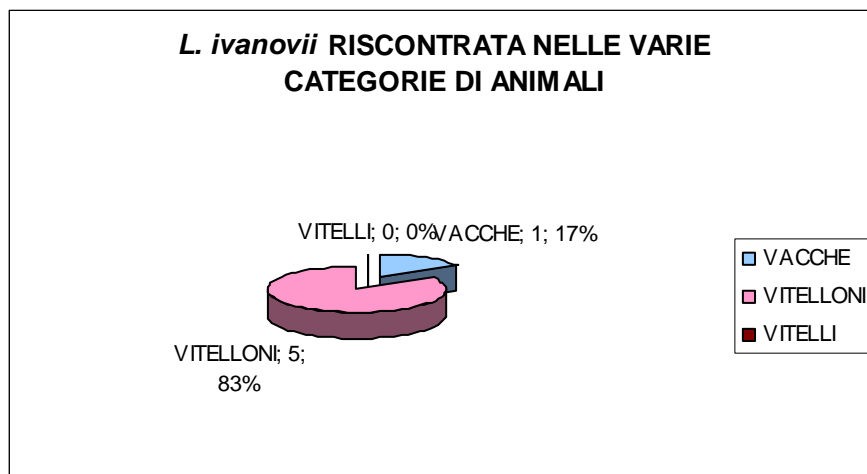


Grafico n°16

<i>L. welshimeri</i> RICONTRATA NELLE VARIE CATEGORIE DI ANIMALI	
TOTALE	24
VACCHE	10
VITELLONI	9
VITELLI	5

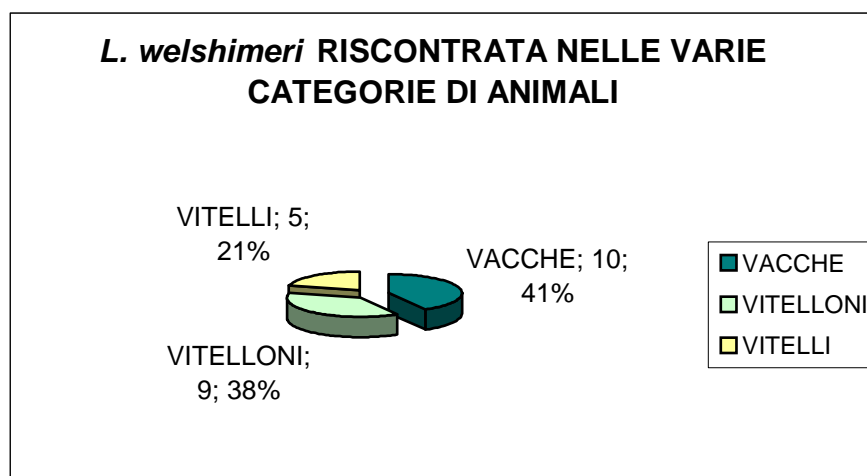


Grafico n°17

<i>L. seeligeri</i> RICONTRATA NELLE VARIE CATEGORIE DI ANIMALI	
TOTALE	1
VACCHE	1
VITELLONI	0
VITELLI	0

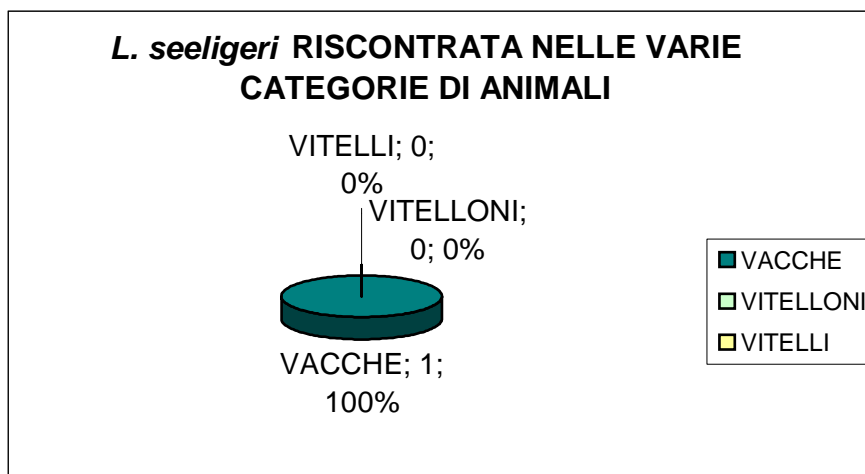


Grafico n°18

**ANDAMENTO STAGIONALE DI POSITIVITA' DEI VITELLONI
DAL 02/02/2009 AL 12/05/2009**

02/02/2009	5
09/02/2009	7
16/02/2009	0
23/02/2009	2
02/03/2009	3
23/03/2009	2
04/05/2009	1
11/05/2009	2
12/05/2009	2

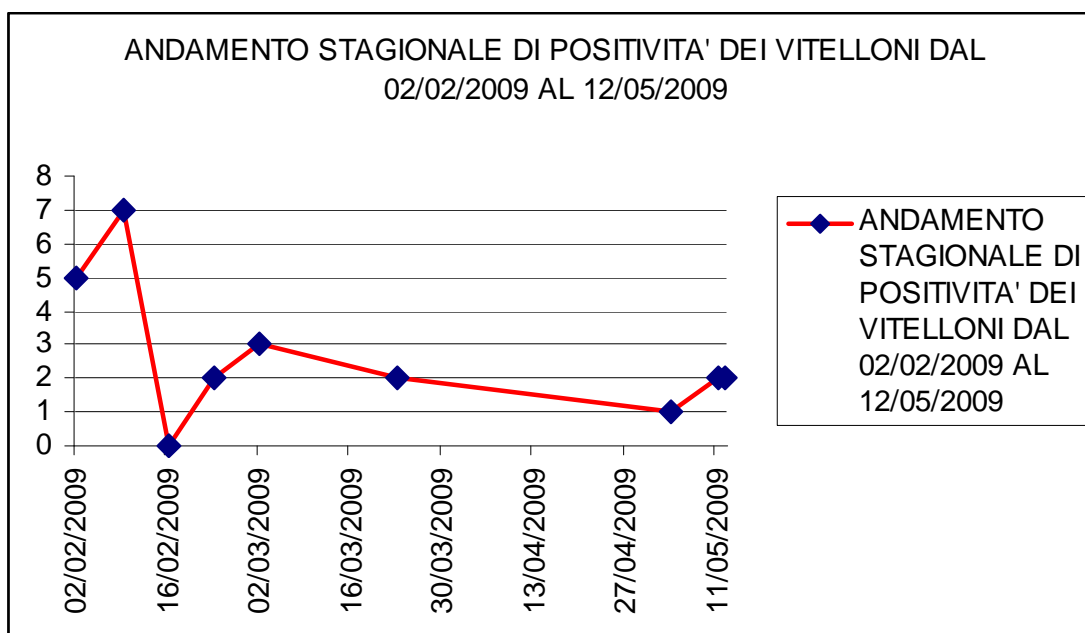


Grafico n°19

**ANDAMENTO STAGIONALE DI POSITIVITA' DEI VITELLONI
DAL 02/11/2009 AL 12/05/2010**

02/11/2009	0
02/12/2009	0
20/01/2010	4
03/02/2010	0
17/02/2010	0
03/03/2010	2
16/03/2010	10
12/05/2010	6

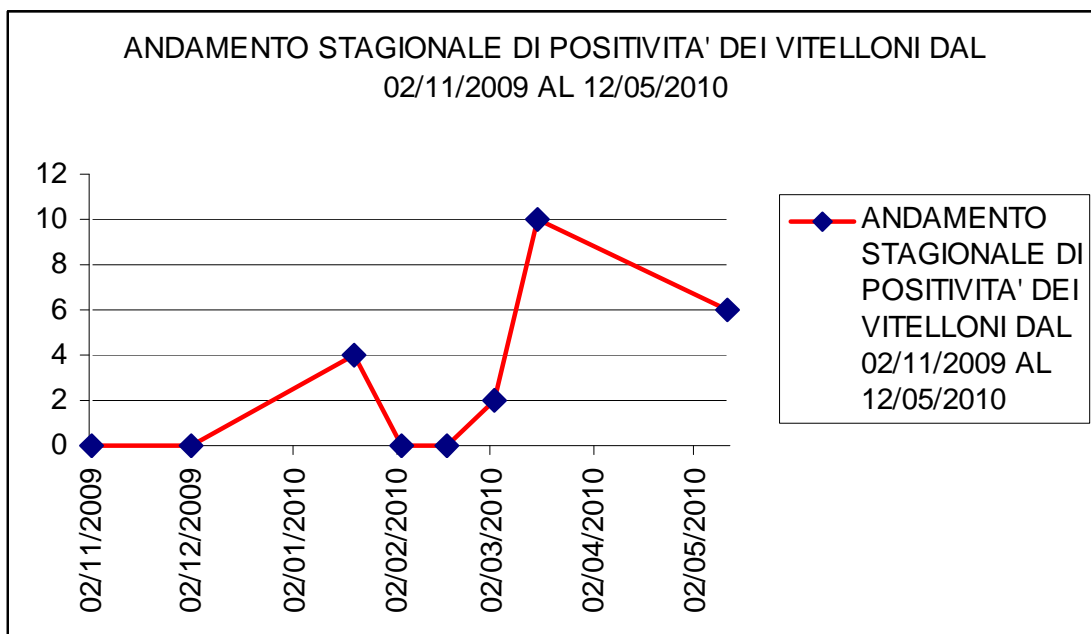


Grafico n°20

ANDAMENTO STAGIONALE DI POSITIVITA' DEI VITELLI DAL 02/02/2009 AL 12/05/2009	
02/02/2009	0
09/02/2009	0
16/02/2009	1
23/02/2009	0
02/03/2009	0
23/03/2009	0
04/05/2009	1
11/05/2009	0
12/05/2009	0

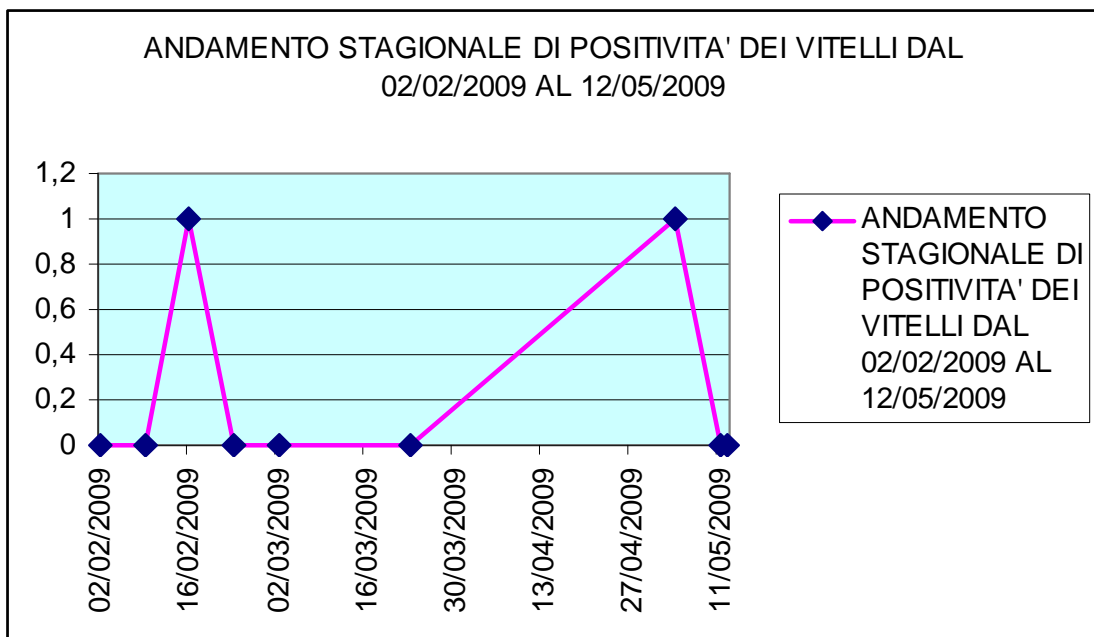


Grafico n°21

**ANDAMENTO STAGIONALE DI POSITIVITA' DEI VITELLI
DAL 02/11/2009 AL 12/05/2010**

02/11/2009	0
02/12/2009	0
20/01/2010	3
03/02/2010	13
17/02/2010	0
03/03/2010	0
16/03/2010	1
12/05/2010	0

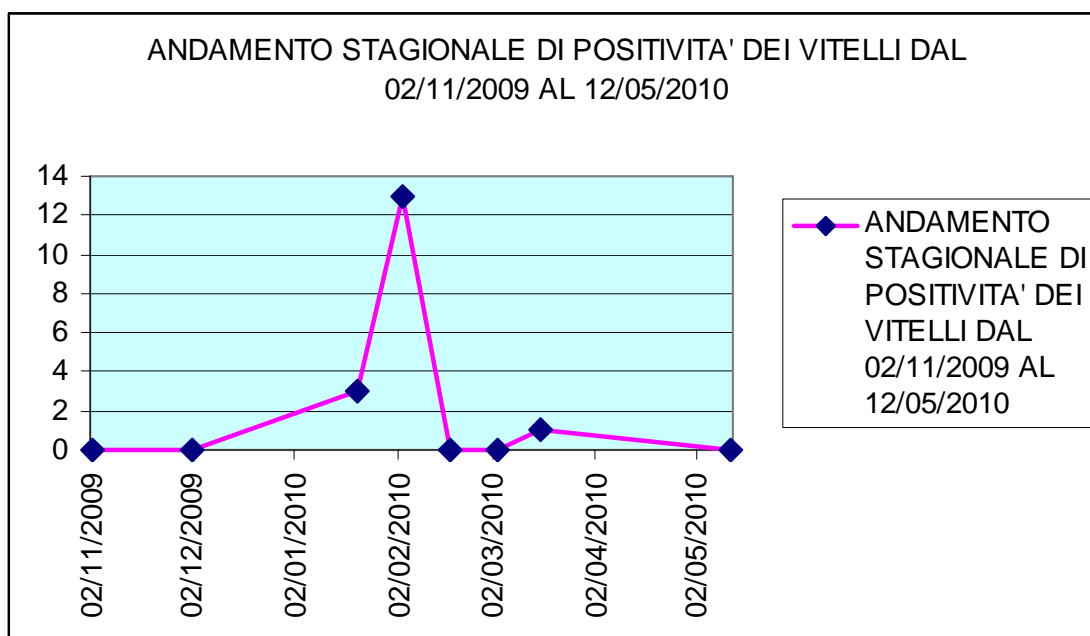


Grafico n°22

ANDAMENTO STAGIONALE DI POSITIVITA' DELLE VACCHE DAL 02/02/2009 AL 12/05/2009	
02/02/2009	0
09/02/2009	0
16/02/2009	0
23/02/2009	0
02/03/2009	0
23/03/2009	0
04/05/2009	3
11/05/2009	4
12/05/2009	0

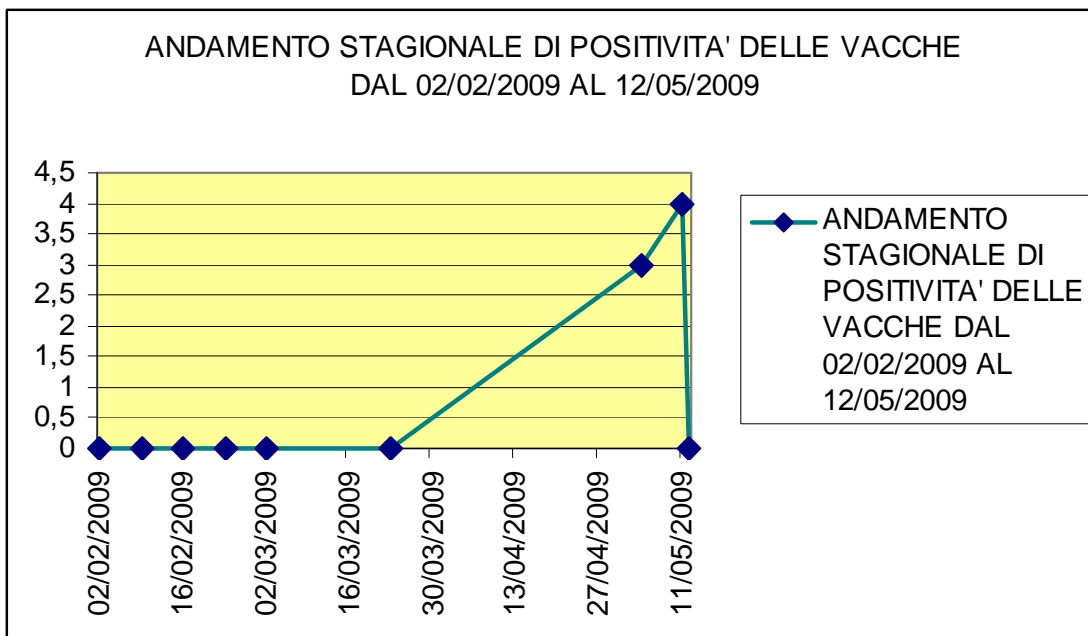


Grafico n°23

**ANDAMENTO STAGIONALE DI POSITIVITA' DEI VITELLONI
DAL 02/11/2009 AL 12/05/2010**

02/11/2009	2
02/12/2009	3
20/01/2010	0
03/02/2010	4
17/02/2010	4
03/03/2010	4
16/03/2010	0
12/05/2010	9

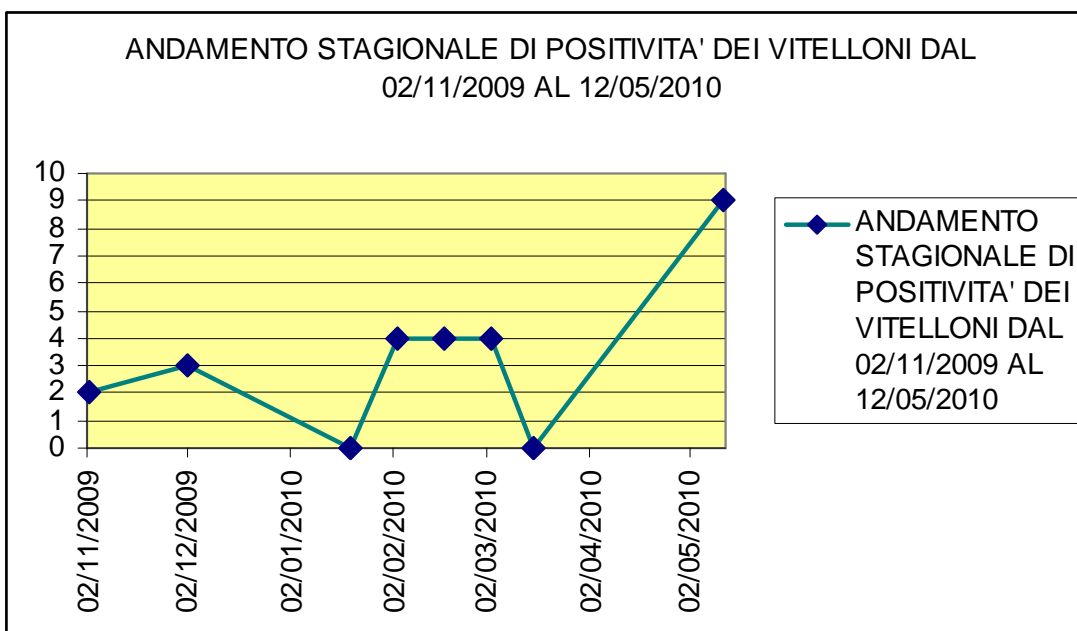


Grafico n°24

2. RISULTATI DELL'ANTIBIOGRAMMA

I risultati ottenuti, per quanto riguarda i ceppi di *Listeria* sottoposti a test, si possono riassumere nei seguenti punti:

1. tutti i ceppi testati, sia di (*L. monocytogenes* che di *L. ivanovii*), sono risultati resistenti alla colistina e all'acido nalidixico,
2. tutti i ceppi di *Listeria* sopra indicati, invece, sono risultati sensibili all'ampicillina e all'associazione amoxicillina+ acido clavulanico,
3. per quanto riguarda in particolare i 17 ceppi di *L. monocytogenes* testati, sono risultati quasi tutti sensibili alla maggior parte degli antibiotici impiegati nel test, salvo che per un ceppo specifico di *L. monocytogenes* isolato da un vitellone,
4. anche per quanto riguarda i 3 ceppi di *L. ivanovii* testati, i risultati sono interessanti perché si evidenziano stati di antibiotico-resistenza differenti e articolati,
5. Il ceppo 175 di *L. ivanovii*, esso è risultato resistente a 8 dei 16 antibiotici testati, per 4 principi attivi le risposte sono state intermedie e il ceppo è risultato sensibile a soli 4 antibiotici,
6. Il ceppo 172 di *L. ivanovii*, esso è risultato resistente a 12 dei 16 antibiotici testati, per 2 principi attivi le risposte sono state intermedie e il ceppo è risultato sensibile a soli 2 antibiotici,
7. Il ceppo 15 di *L. monocytogenes* isolato da un vitellone, esso è risultato resistente a 8 dei 16 antibiotici testati, per 4 principi attivi le risposte sono state intermedie e il ceppo è risultato sensibile a soli 4 antibiotici.

2.1 GRAFICI

Più specificamente si riassumono i risultati ottenuti tramite i seguenti grafici divisi per antibiotico e per le due specie di *Listeria*, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*. (grafici dal n°25 al n°56)

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. monocytogenes</i> PER LA COLISTINA	
	TOTALE CEPPI
<i>L. monocytogenes</i>	17
Resistenti	17
Sensibili	0
Intermedi	0

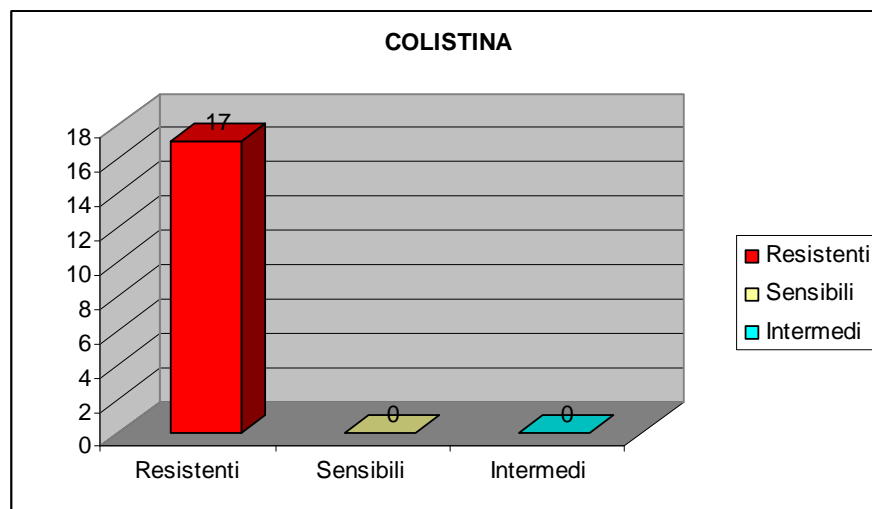


Grafico n°25

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. monocytogenes</i> PER L'ASSOCIAZIONE SULFAMIDICI E TRIMETHOPRIM	
	TOTALE CEPPI
<i>L. monocytogenes</i>	17
Resistenti	0
Sensibili	17
Intermedi	0

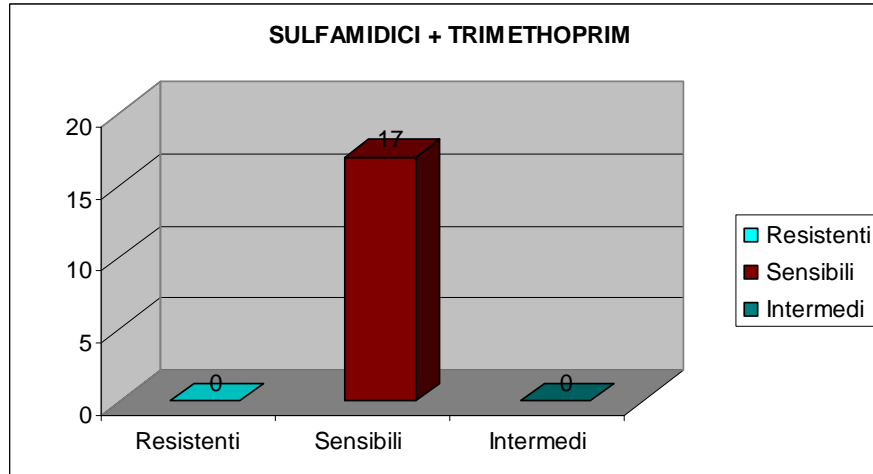


Grafico n°26

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. monocytogenes</i> PER LA KANAMICINA	
	TOTALE CEPPI
<i>L. monocytogenes</i>	17
Resistenti	2
Sensibili	15
Intermedi	0

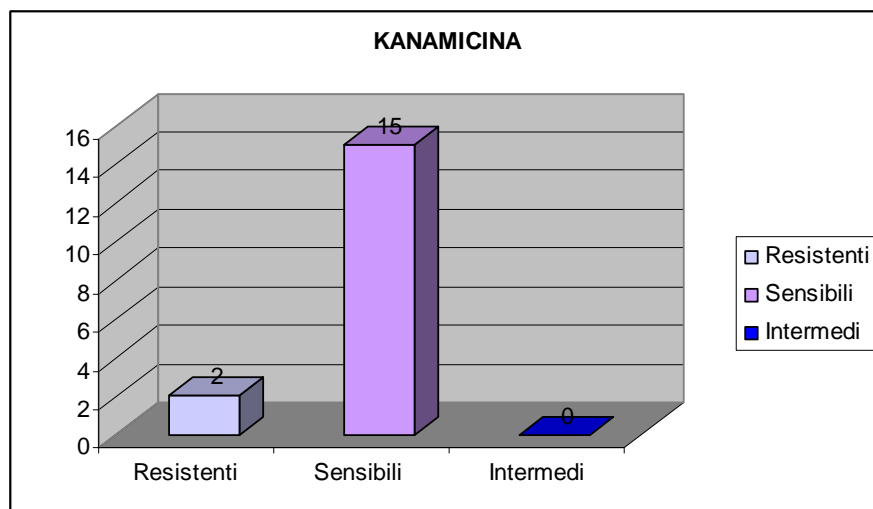


Grafico n°27

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. monocytogenes</i> PER LA NEOMICINA	
	TOTALE CEPPI
<i>L. monocytogenes</i>	17
Resistenti	3
Sensibili	13
Intermedi	1

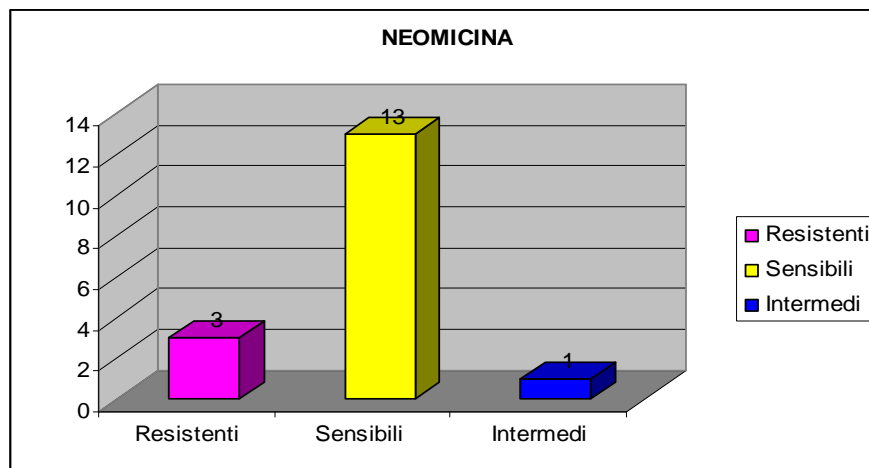


Grafico n°28

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. monocytogenes</i> PER LA LA GENTAMICINA	
	TOTALE CEPPI
<i>L. monocytogenes</i>	17
Resistenti	2
Sensibili	15
Intermedi	0

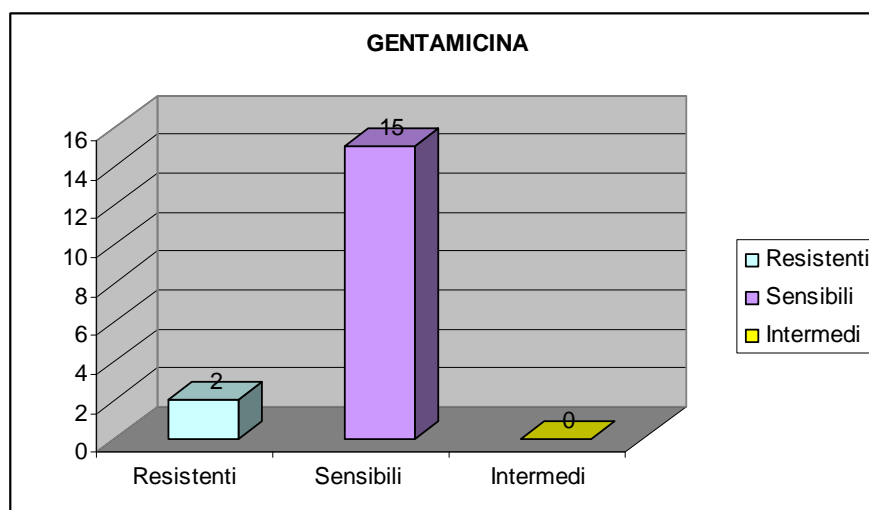


Grafico n°29

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. monocytogenes</i> PER L'ASSOCIAZIONE IL CEFOTAXINE	
	TOTALE CEPPI
<i>L. monocytogenes</i>	17
Resistenti	3
Sensibili	0
Intermedi	14

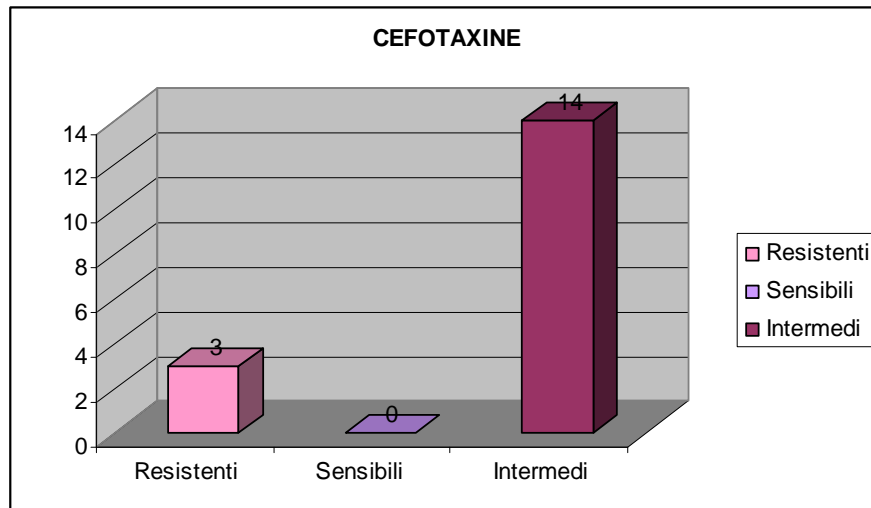


Grafico n°30

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. monocytogenes</i> PER L'ASSOCIAZIONE AMOXICILINA E AC. CLAVULANICO	
	TOTALE CEPPI
<i>L. monocytogenes</i>	17
Resistenti	0
Sensibili	17
Intermedi	0

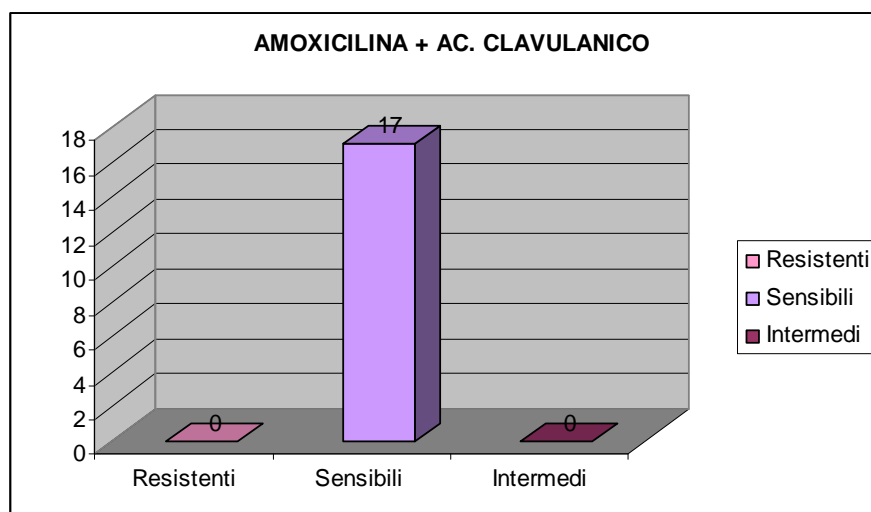


Grafico n°31

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. monocytogenes</i> PER L'ASSOCIAZIONE L'AC. NALIDIXICO	
	TOTALE CEPPI
<i>L. monocytogenes</i>	17
Resistenti	17
Sensibili	0
Intermedi	0

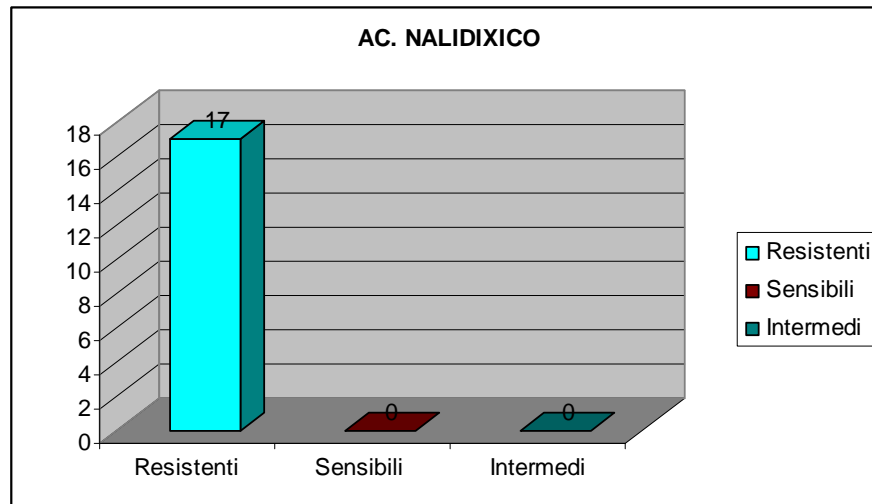


Grafico n°32

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. monocytogenes</i> PER LA TETRACICLINA	
	TOTALE CEPPI
<i>L. monocytogenes</i>	17
Resistenti	1
Sensibili	14
Intermedi	2

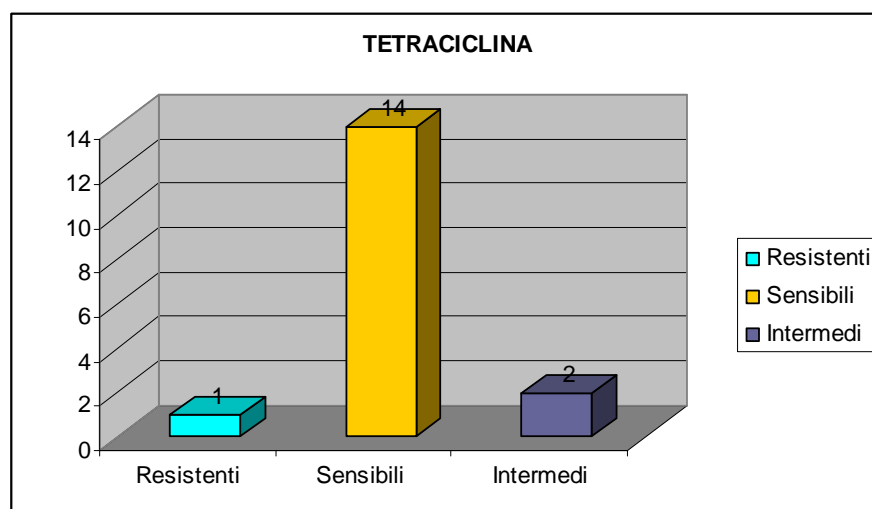


Grafico n°33

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. monocytogenes</i> PER L'AMPICILLINA	
	TOTALE CEPPI
<i>L. monocytogenes</i>	17
Resistenti	0
Sensibili	0
Intermedi	17

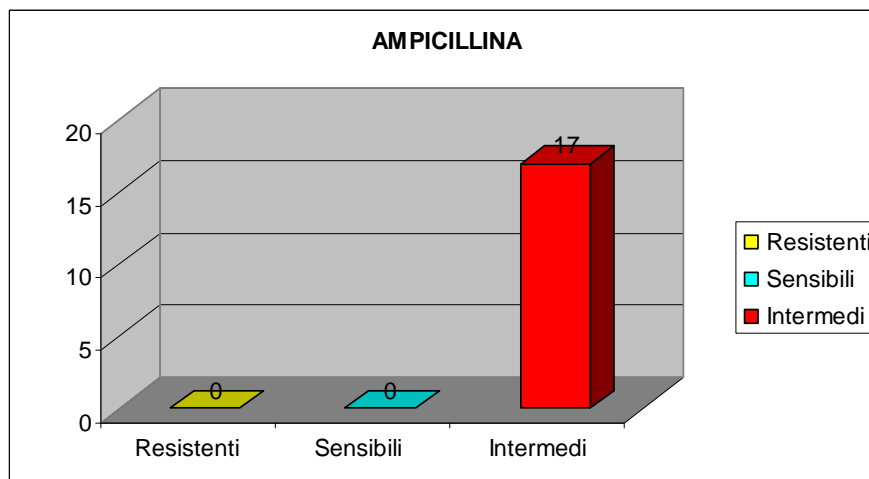


Grafico n°34

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. monocytogenes</i> PER LA STREPTOMICINA	
	TOTALE CEPPI
<i>L. monocytogenes</i>	17
Resistenti	4
Sensibili	7
Intermedi	6

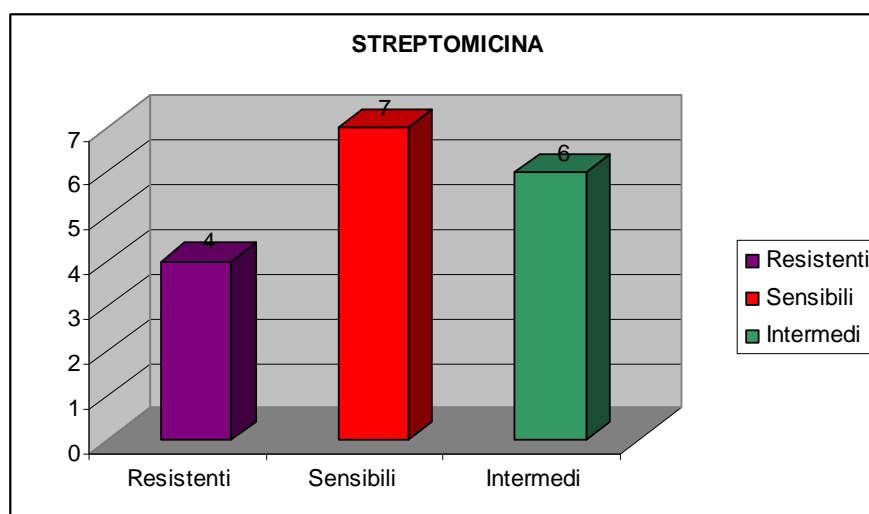


Grafico n°35

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. monocytogenes</i> PER IL TRIPLO SULFAMIDICO (TSS)	
	TOTALE CEPPI
<i>L. monocytogenes</i>	17
Resistenti	2
Sensibili	15
Intermedi	0

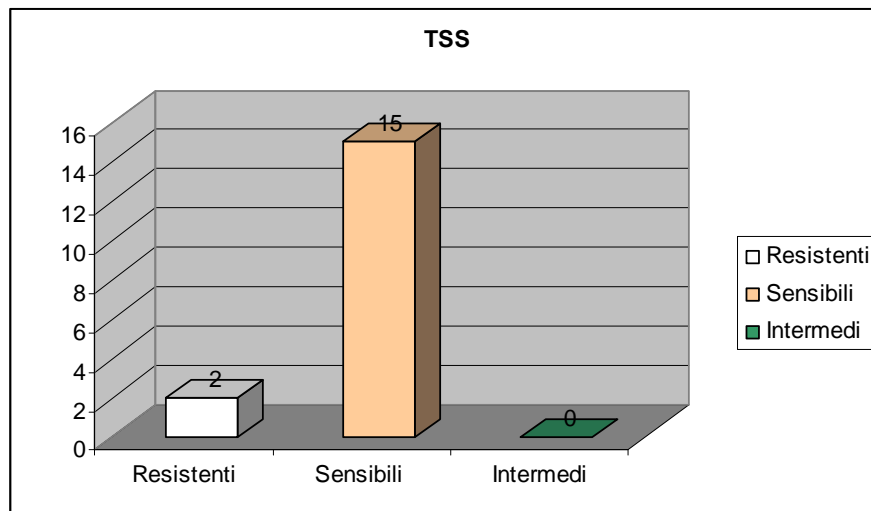


Grafico n°36

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. monocytogenes</i> PER IL CLORAMFENICOLO	
	TOTALE CEPPI
<i>L. monocytogenes</i>	17
Resistenti	0
Sensibili	17
Intermedi	0

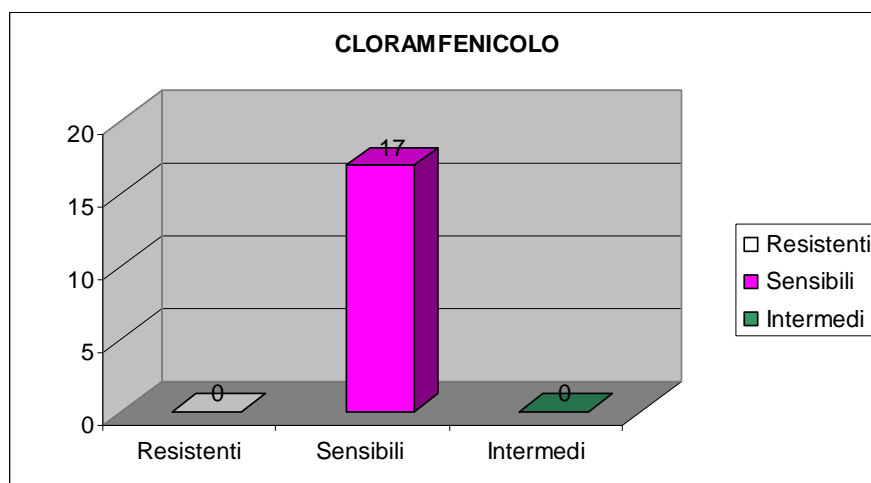


Grafico n°37

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. monocytogenes</i> PER LA CEFALOTINA	
	TOTALE CEPPI
<i>L. monocytogenes</i>	17
Resistenti	1
Sensibili	13
Intermedi	3

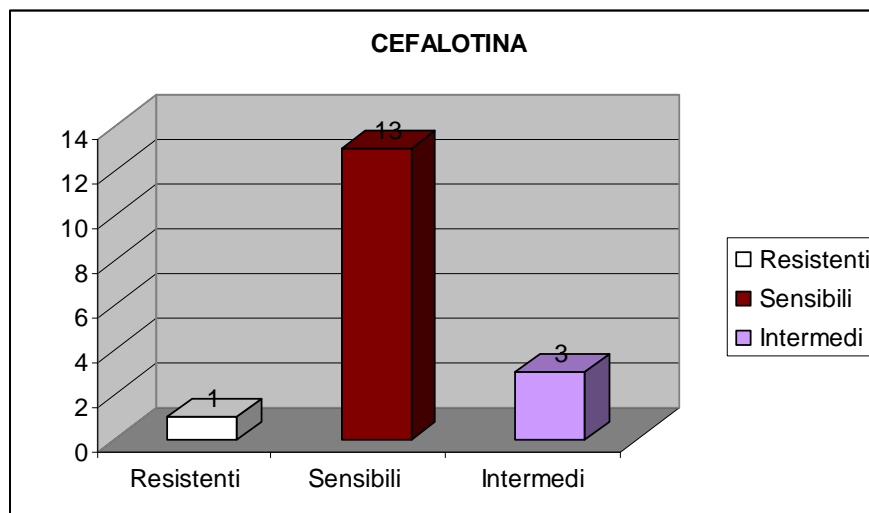


Grafico n°38

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. monocytogenes</i> PER ENROFLOXACIN	
	TOTALE CEPPI
<i>L. monocytogenes</i>	17
Resistenti	1
Sensibili	10
Intermedi	6

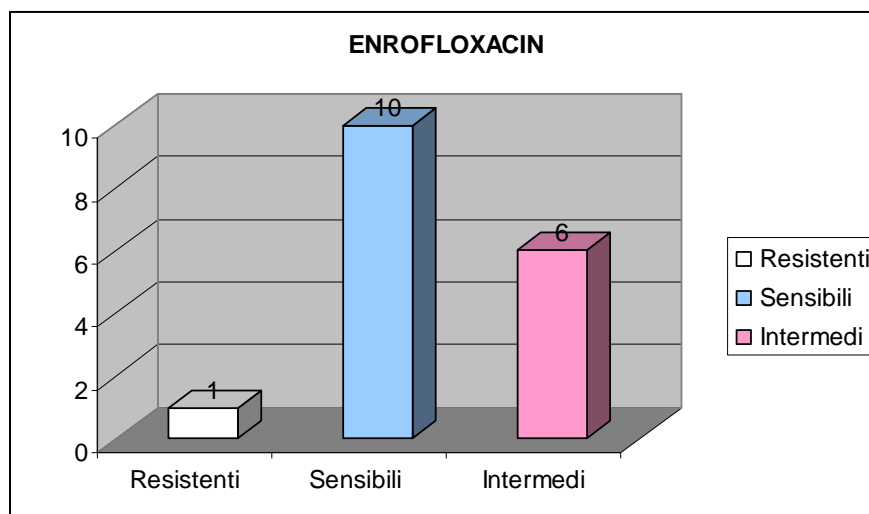


Grafico n°39

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. monocytogenes</i> PER CIPROFLOXACINA	
	TOTALE CEPPI
<i>L. monocytogenes</i>	17
Resistenti	2
Sensibili	5
Intermedi	10

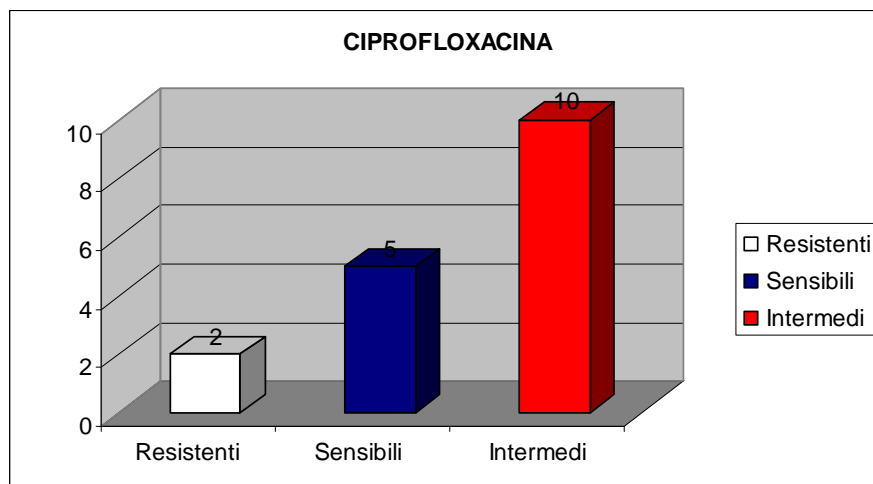


Grafico n°40

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. ivanovii</i> PER LA COLISTINA	
	TOTALE CEPPI
<i>L. ivanovii</i>	3
Resistenti	3
Sensibili	0
Intermedi	0

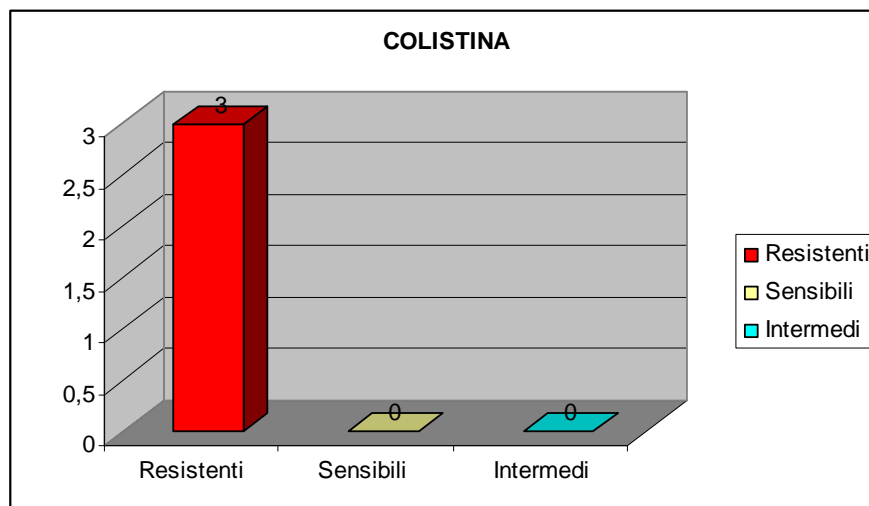


Grafico n° 41

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. ivanovii</i> PER L'ASSOCIAZIONE SULFAMIDICI E TRIMETHOPRIM	
	TOTALE CEPPI
<i>L. ivanovii</i>	3
Resistenti	1
Sensibili	2
Intermedi	0

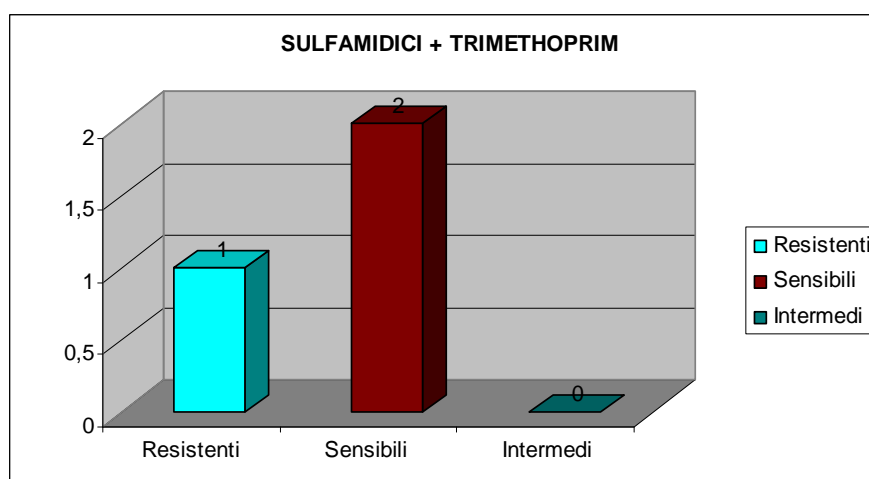


Grafico n°42

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. ivanovii</i> PER LA KANAMICINA	
	TOTALE CEPPI
<i>L. ivanovii</i>	3
Resistenti	2
Sensibili	1
Intermedi	0

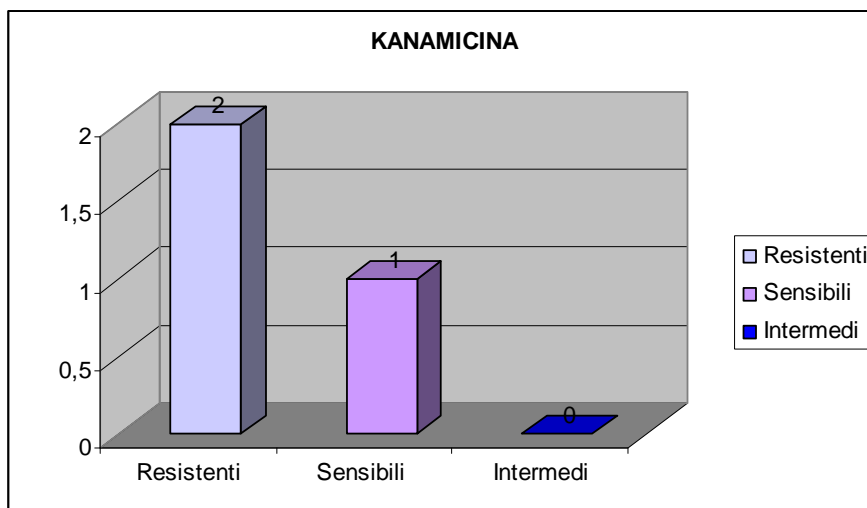


Grafico n°43

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. ivanovii</i> PER LA NEOMICINA	
	TOTALE CEPPI
<i>L. ivanovii</i>	3
Resistenti	2
Sensibili	1
Intermedi	0

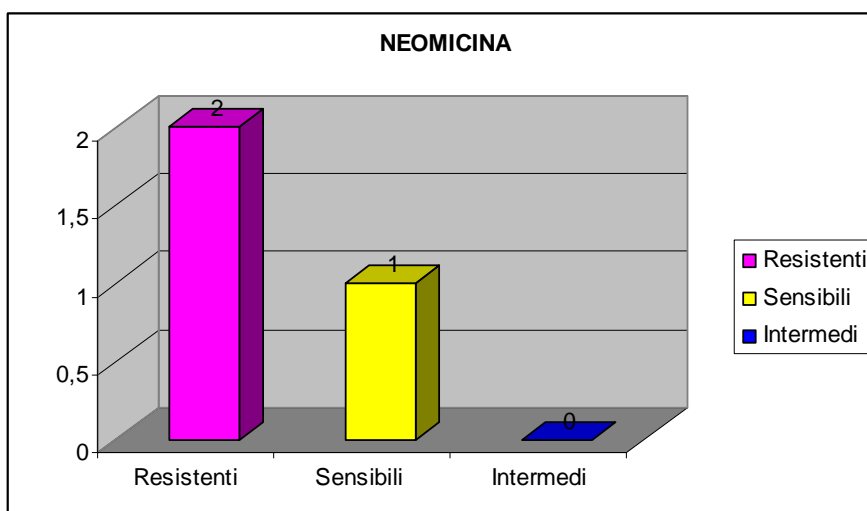


Grafico n°44

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. ivanovii</i> PER LA GENTAMICINA	
	TOTALE CEPPI
<i>L. ivanovii</i>	3
Resistenti	2
Sensibili	1
Intermedi	0

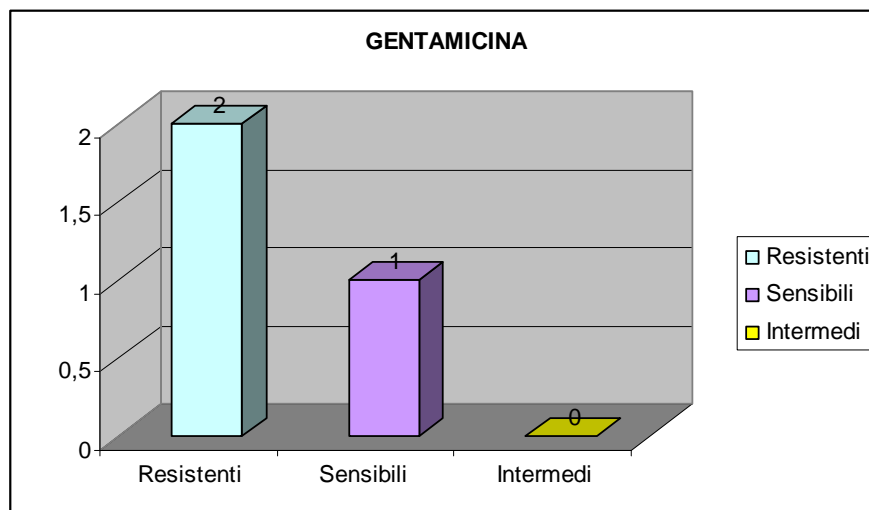


Grafico n°45

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. ivanovii</i> PER LO CEFOTAXINE	
	TOTALE CEPPI
<i>L. ivanovii</i>	3
Resistenti	1
Sensibili	0
Intermedi	2

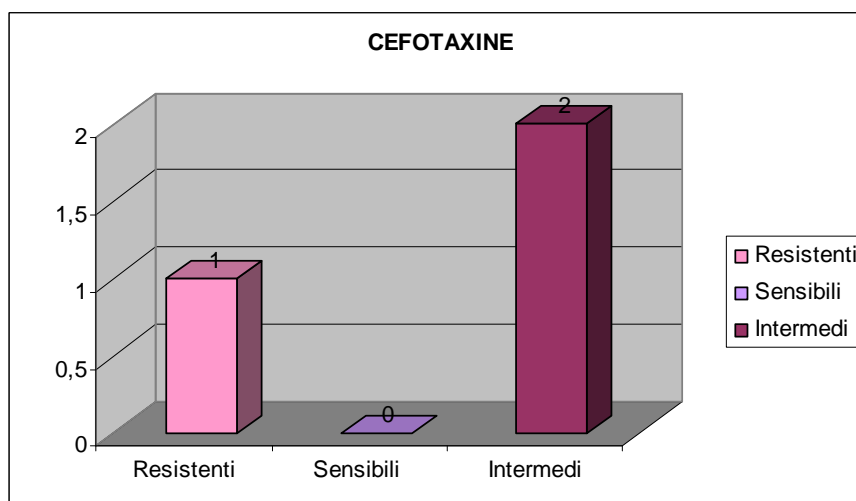


Grafico n°46

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. ivanovii</i> PER AMOXICILINA E AC. CLAVULANICO	
	TOTALE CEPPI
<i>L. ivanovii</i>	3
Resistenti	0
Sensibili	3
Intermedi	0

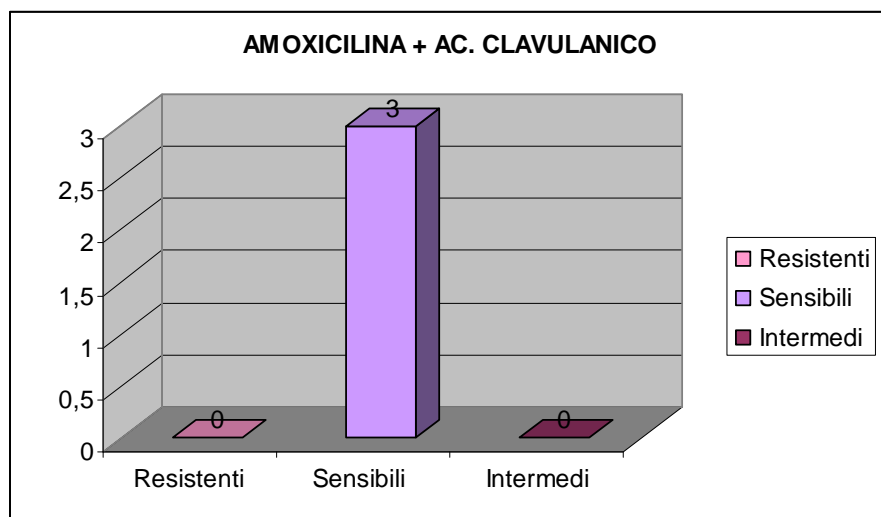


Grafico n°47

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. ivanovii</i> PER AC. NALIDIXICO	
	TOTALE CEPPI
<i>L. ivanovii</i>	3
Resistenti	3
Sensibili	0
Intermedi	0

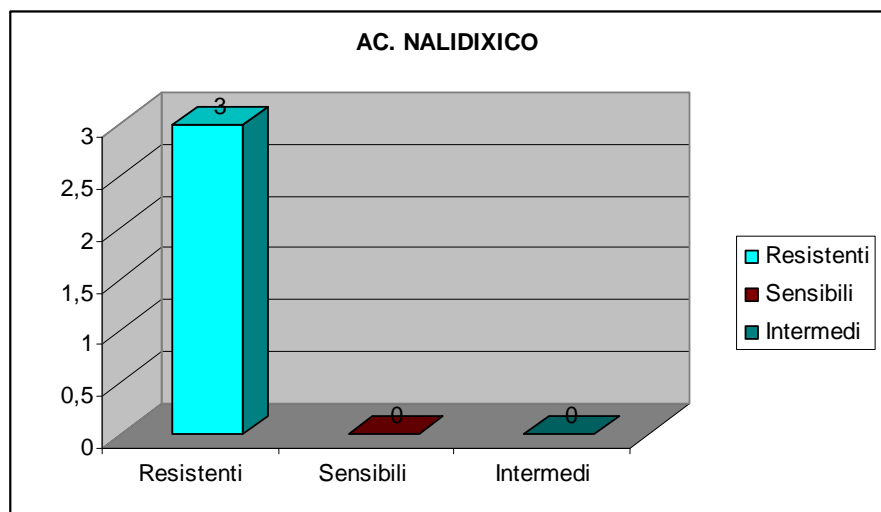


Grafico n°48

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. ivanovii</i> PER TETRACICLINA	
	TOTALE CEPPI
<i>L. ivanovii</i>	3
Resistenti	0
Sensibili	1
Intermedi	2

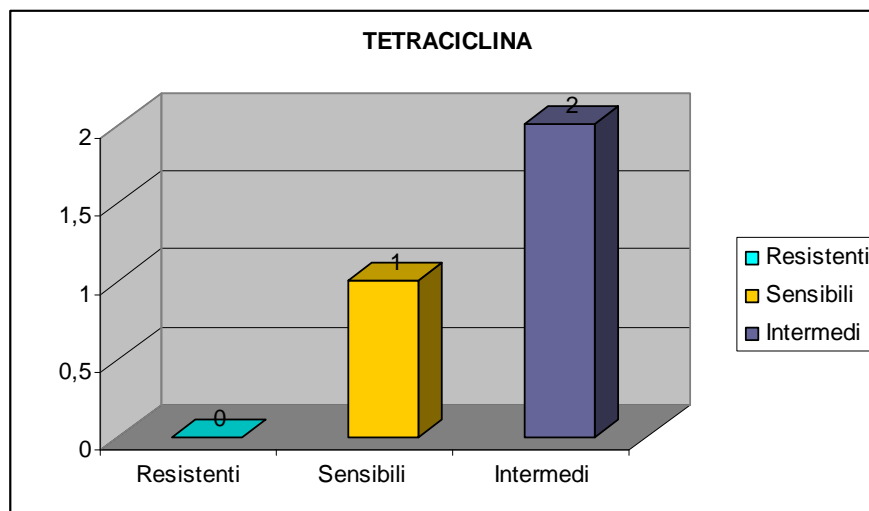


Grafico n°49

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. ivanovii</i> PER L'AMPICILLINA	
	TOTALE CEPPI
<i>L. ivanovii</i>	3
Resistenti	0
Sensibili	0
Intermedi	3

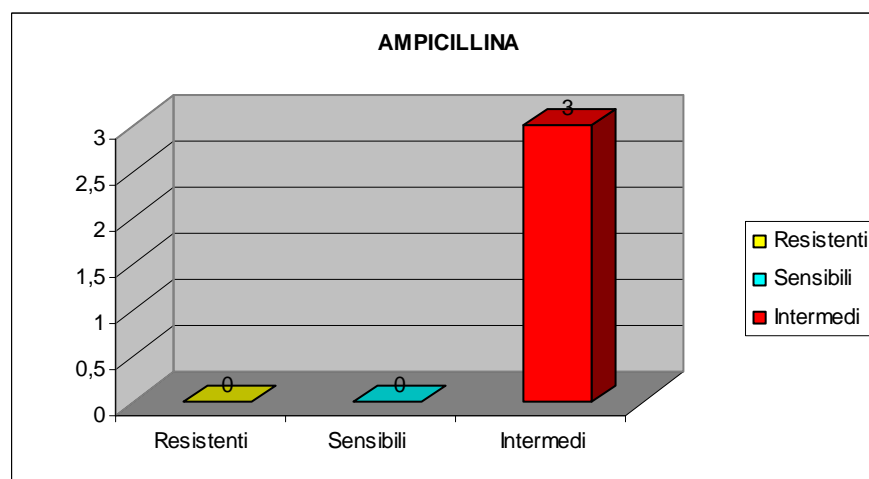


Grafico n° 50

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. ivanovii</i> PER LA STREPTOMICINA	
	TOTALE CEPPI
<i>L. ivanovii</i>	3
Resistenti	2
Sensibili	0
Intermedi	1

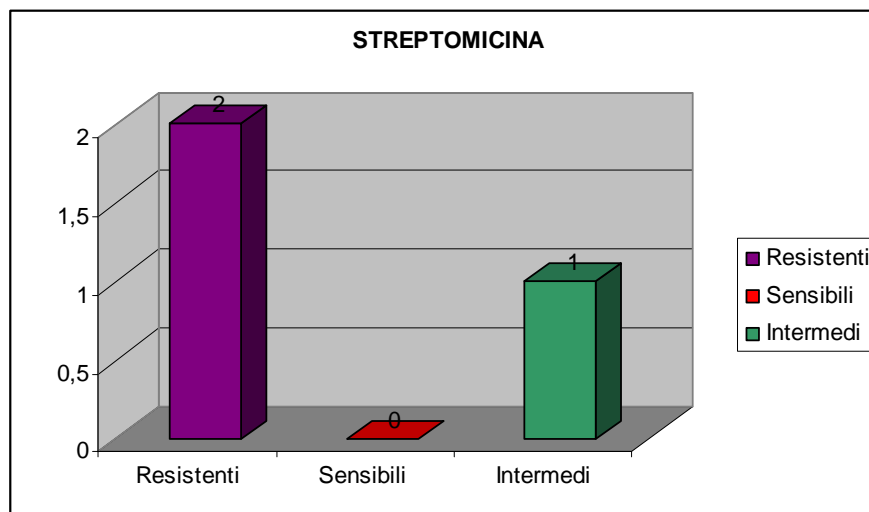


Grafico n°51

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. ivanovii</i> PER IL TRIPLO SULFAMIDICO (TSS)	
	TOTALE CEPPI
<i>L. ivanovii</i>	3
Resistenti	2
Sensibili	1
Intermedi	0

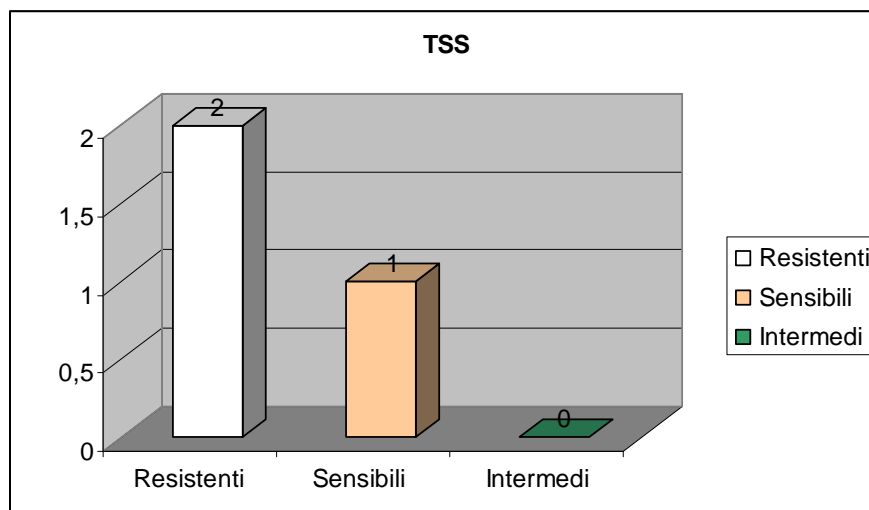


Grafico n°52

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. ivanovii</i> PER IL CLORAMFENICOLO	
	TOTALE CEPPI
<i>L. ivanovii</i>	3
Resistenti	1
Sensibili	2
Intermedi	0

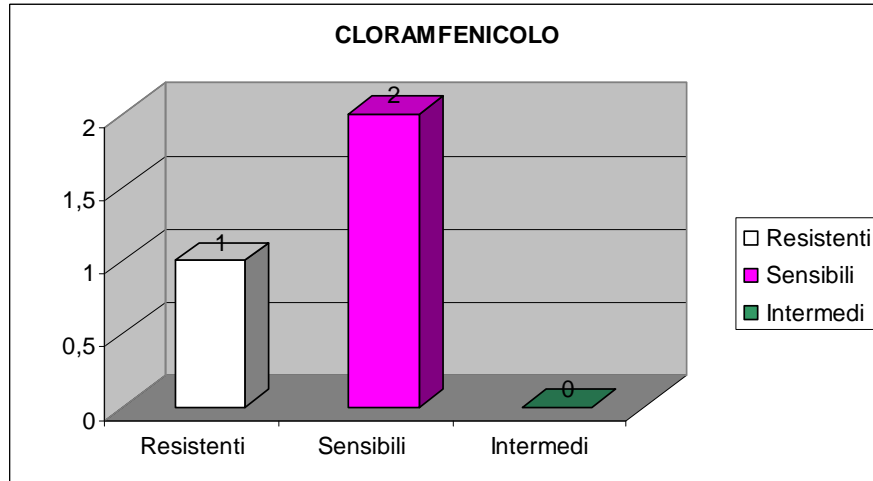


Grafico n°53

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. ivanovii</i> PER CEFALOTINA	
	TOTALE CEPPI
<i>L. ivanovii</i>	3
Resistenti	1
Sensibili	1
Intermedi	1

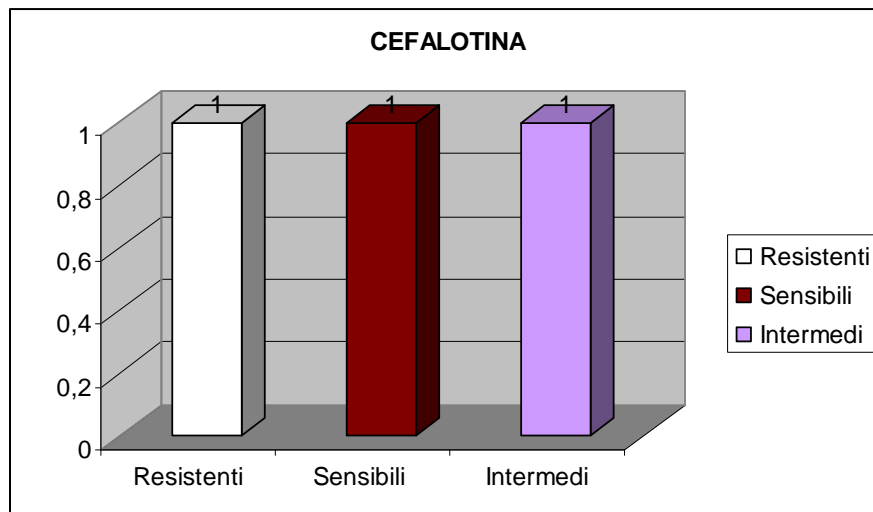


Grafico n°54

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. ivanovii</i> PER ENROFLOXACIN	
	TOTALE CEPPI
<i>L. ivanovii</i>	3
Resistenti	1
Sensibili	1
Intermedi	1

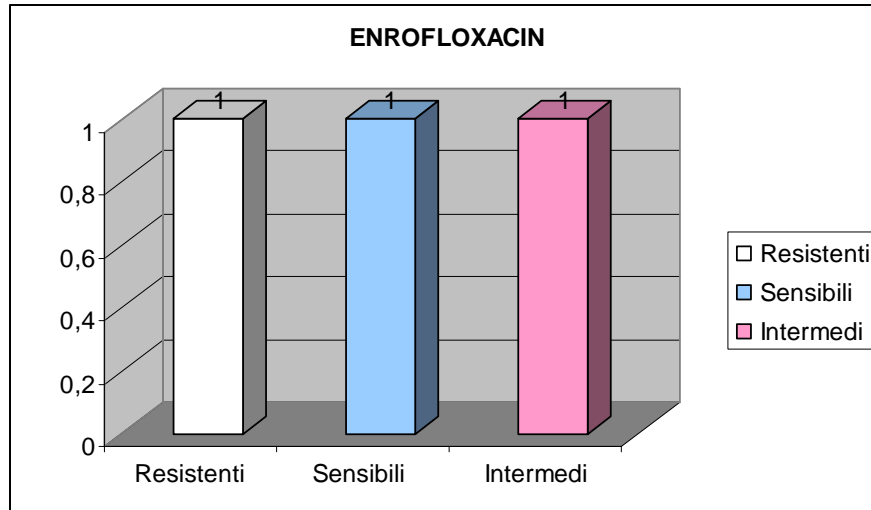


Grafico n°55

RISPOSTA DEI CEPPI DI <i>L. ivanovii</i> PER CIPROFLOXACIN	
	TOTALE CEPPI
<i>L. ivanovii</i>	3
Resistenti	1
Sensibili	1
Intermedi	1

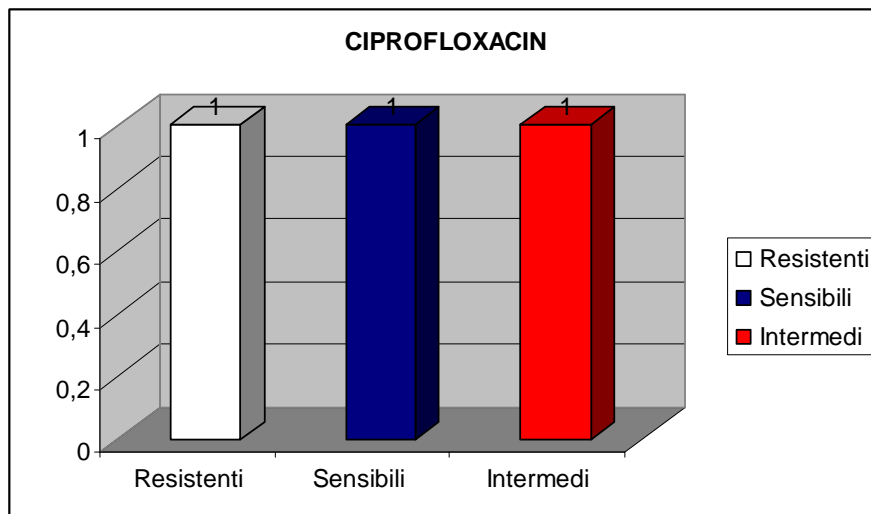


Grafico n°56

4.CONCLUSIONI

I dati ottenuti con questa tesi sono i primi in Italia disponibili sulla prevalenza di *L. monocytogenes* nei bovini regolarmente macellati e confermano che questi animali sono portatori asintomatici di *L. monocytogenes* nel contenuto intestinale.

Alcuni ceppi di *L. monocytogenes* sono in grado di persistere anche molto a lungo nell'ambiente esterno; di conseguenza, si può ipotizzare una loro persistenza anche negli allevamenti e che da qui i ceppi possano inquinare sia la filiera del latte e conseguentemente i caseifici (con il latte crudo) sia la filiera delle carni, attraverso la fase di macellazione degli animali (Silva *et al.*, 2003; Kabuki *et al.*, 2004; Hoffman *et al.*, 2003; Lappi *et al.*, 2004; Thimothe *et al.*, 2004).

Grazie alle tecniche di analisi biomolecolare sul DNA, inoltre, sappiamo che i cloni "ambientali" di *L. monocytogenes* sovente sono indistinguibili da quelli associati a casi clinici di listeriosi umana (Borucki *et al.*, 2004; Nightingale *et al.*, 2004). Ciò sta a indicare che i bovini possono essere un serbatoio importante di ceppi di *L. monocytogenes* potenzialmente molto pericolosi per la salute umana.

Con questa tesi emerge un dato che apparentemente può sembrare non in linea con quanto emerge dalla bibliografia specialistica.

Il maggior numero di isolamenti di *Listeria* lo si è avuto nei vitelloni da carne, mentre in generale i pochi dati della bibliografia tendono a sottolineare che sono le vacche a fine carriera i soggetti che più degli altri sono portatori asintomatici di *L. monocytogenes*. Probabilmente per il fatto che le vacche sono più esposte al rischio di diventare portatrici perché sono alimentate con insilati, spesso quest'ultimi sono facilmente inquinati dalle listerie.

La prevalenza generale rilevata con questa tesi (8,92%) è circa doppia rispetto a quella riportata in Turchia da Kalender (2003), dove nei bovini macellati in quel paese ha riscontrato una prevalenza per *Listeria* spp. del 4,6% e per *L. monocytogenes* dello 0,58%.

In Spagna si sono registrate percentuali di positività molto più elevate (21,3%), soprattutto nei bovini da latte, per via degli insilati (Esteban, 2008). Negli Stati Uniti, su un totale di 323 capi bovini esaminati, si è stimata una prevalenza di portatori asintomatici del 29,4% (Nightingale, 2004). Una prevalenza inferiore è stata riscontrata nei bovini macellati in Irlanda del Nord: 10 portatori sani su 220 bovini testati (4,8%) (Madden, 2006). In Svezia, su 102 campioni di feci di bovini clinicamente sani, *L. monocytogenes* è stata isolata nel 6% dei casi (Unnertad, 2000). La *European Food Safety Authority* riporta una prevalenza del 4,6% nelle vacche da latte in Germania (Anonimo, 2006). I nostri dati italiani, quindi, si attestano su valori all'incirca analoghi.

I dati ottenuti circa la presenza di *Listeria* spp. nei bovini regolarmente macellati confermano quindi che questi animali possono essere portatori asintomatici di *L. monocytogenes* nel contenuto intestinale.

Anche fra gli animali da reddito si stanno diffondendo cloni antibiotico-resistenti di *L. monocytogenes*, come ha sottolineato anche il recente Scientific Report EFSA “*The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008*” (EFSA, 2010). Il Report non prende in considerazione i cloni antibiotico-resistenti di *L. monocytogenes*, invece con tale ricerca si ottiene un altro risultato importante, ossia la scoperta della circolazione di cloni di *L.*

monocytogenes antibiotico-resistenti fra i bovini macellati in Italia del Nord.

Molto significativa è la diffusione tra i bovini di ceppi di *L. monocytogenes* resistenti a uno o due antibiotici.

Conte e coll. (2007) hanno valutato la sensibilità agli antibiotici di 38 ceppi di *L. monocytogenes* isolati da 542 campioni provenienti da alimenti e ambienti di lavorazione, nei confronti di 22 antibiotici comunemente impiegati nella clinica veterinaria e non quella umana. Questo studio ha dimostrato che i ceppi isolati di *L. monocytogenes* sono sensibili agli antibiotici testati; ma hanno visto che *L. monocytogenes* sta aumentando la sua resistenza per molti antibiotici. Questa tesi è in accordo anche con tale studio.

È necessario approfondire ulteriormente le indagini valutando come allevamento e tipo di alimentazione possono influire su tali valori di prevalenza. Si conferma comunque l'obiettivo della tesi ossia quello di individuare e di confermare che il contenuto intestinale dei bovini macellati può costituire una possibile fonte di inquinamento da *Listeria monocytogenes* e di altre specie di *Listeria* delle carni fresche e dei prodotti derivati.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Aase B., Sundheim G., Rørwick L.M. (2000) "Occurrence and possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*". Int. J. Food Microbiol., 62, 57-63.
2. Adak G.K., Long S.M., O'Brien S.J. (2002) "Trends in indigenous food-borne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000". Gut, 51, 832-841.
3. Anonimo (2006) "The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and food-borne outbreaks in the European Union in 2005". EFSA Journal, 94, 3-288.
4. Aureli P., Ferrini A.M., Mannoni V., Hodzie S., Wedell-Weergard C., Oliva B. (2003) "Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics". Int. J. Food Microbiol., 83, 325-330.
5. Aurora R., Prakash A., Prakash S. (2009) "Genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from milk and ready-to-eat indigenous milk products". Food Control 20 (2009) 835–839.
6. Awuah G.B., Ramaswamy H.S., Economides A., Mallikarjunan K. (2005) "Inactivation of *Escherichia coli* K 12 and *Listeria innocua* in milk using radio frequency (RF) heating". Innovative Food Science and Emerging Technologies, 6, 396-402.
7. Beuchat L. (2002) "Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables". Microbes Infection, 4, 413-423.
8. Bhatti M., Veeramachaneni A., Shelef L.A. (2004) "Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk". Int. J. Food Microbiol., 97, 715-719.
9. Birzele B., Djordjević S., Krämer J. (2005) "A study of the role of different nitrite concentrations on human pathogenic bacteria in fresh spreadable ham and onion sausage". Food Control, 16, 695-699.
10. Bohaychuck W.M., Gensler G.E., King R.K., Manninen K.I., Sorensen O., Wu J.T., Stiles M.E., McMullen L.M. (2006) "Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail market place in Edmonton, Alberta, Canada". J. Food Protect., 69, 2176-2182.
11. Borucki M. K., Call D. R. (2003) "*Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR". J. Clin. Microbiol., 41, 5537-5540.

12. Brosch R., Brett M., Catimel B., Luchansky J.B., Ojeniyi B., Rocourt J. (1996) "Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)". *Int. J. Food Microbiol.*, 32, 343-355.
13. Chae M.S., Schraft H. (2000) "Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains". *Int. J. Food Microbiol.* 62, 103–111.
14. Colavita G., Vercellotti L., Pavoletti E., Chiesa F., De Palma D., Poggiana B., Miotello Fantoni F., Miotti-Scapin R., Radu I., Giaccone V. (2009) "Prevalenza di *Listeria monocytogenes* in bovini regolarmente macellati: dati preliminari". *Atti Convegno Nazionale Associazioni Italiana dei Veterinari Igienisti (AIVI), Perugia, 24-26 giugno 2009.*
15. Colodner R., Sakran W., Miron D., Tietler N., Khavalevsky E., Kopelov J. (2003) "*Listeria monocytogenes* cross-contamination in a nursery". *AJIC Clinical Case Study*, 322-324.
16. Cummins A.J., Fielding A.K., McLauchlin J. (1994) "*Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS". *J. Infect.*, 28, 89-91.
17. Cunha B.A., Filozov A., Remé P. (2004) "*Listeria monocytogenes* mimicking West Nile encephalitis". *Heart & Lung*, 33, 61-64.
18. Débat Zoguereh D., Badiaga S., Brouqui P. (2003) "Left thalamo-peduncular abscess cause by *Listeria monocytogenes* in a homeless patient". *European J. of Internal Medicine*, 14, 509-510.
19. De Dominicis R. (2003-2006) "Studio ed applicazione di tecniche basate sull'analisi del DNA di microrganismi patogeni per la valutazione della sicurezza degli alimenti" tesi di dottorato in Produzione e Sanità degli Alimenti di Origine Animale, Università di Veterinaria di Napoli, 72-73.
20. Dhanashree B., Otta S.K., Karunasagar I., Karunasagar I. (2003) "Typing of *Listeria monocytogenes* isolates by random amplification of polymorphic DNA". *Indian J. Med. Res.*, 117, 19-24.
21. Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P. (2004) "Differentiation of major *Listeria monocytogenes* serovars by PCR". *J. Clin. Microbiol.*, 42, 3819-3822.
22. Earnshaw A.M., Lawrence L.M. (1998) "Sensitivity to commercial disinfectants, and the occurrence of plasmids within various *Listeria monocytogenes* genotypes isolated from poultry products and the poultry processing environment". *J. Appl. Microbiol.*, 84, 642-648.

23. EFSA (1999) "Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*". European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General.
24. Ertas H. B., Seker E. (2005) "Isolation of *Listeria monocytogenes* from fish intestines and RAPD analysis". Turkish J. Vet. Anim. Sci., 29, 1007-1011.
25. Esteban J., Oporto B., Aduriz G., Juste R., Hurtado A. (2008) "Faecal prevalence and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy cattle, sheep and swine herds in northern Spain". 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, 19-22 April 2008.
26. Fantelli K., Stephan R. (2001) "Prevalence and characteristics of Shiga toxin producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland". Int. J. Food microbial., 70, 63-69.
27. Farber J. M., Wang S. L., Cai Y., Zhang S. (1998) "Changes in populations of *Listeria monocytogenes* inoculated on packaged fresh-cut vegetables". J. Food Protect., 61, 192-195.
28. Farber J.M., Peterkin P.I. (1991) "*Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen". Microbiol. & Molecul. Biol. Rev., 55, 476-511.
29. Farber J.M., Peterkin P.I. (2000) "*Listeria monocytogenes*". In B.M. Lund, T.C. Baird-Parker, G.W. Gould (Eds.) "The microbiological safety and quality of food (Vol. II, pp. 1178-1232)". Gaithersburg: Aspen Publishers Inc., Chapter 44.
30. Fernández Guerrero M.L., Rivas P., Rábago R., Núñez A., Górgolas M., Martinell J. (2004) "Prosthetic valve endocarditis due to *Listeria monocytogenes*. Report of two cases and reviews". International Journal of Infectious Diseases, 8, 97-102. F
31. Flodrops H., Houdon L., Gérardin P., Mesnage R., Edmar A., Picot S., Leriche B., Comoy J. (2005) "Lymphocytic meningitis: *Listeria monocytogenes* is a potential risk in an immunocompetent child". Arch. De Pédiatrie, 12, 1620-1623.
32. Francis G.A., O'Beirne D. (2005) "Variation among strains of *Listeria monocytogenes*: differences in survival on packaged vegetables and in response to heat and acid conditions". Food Control, 16, 687-694.
33. Fretz R., Sagel U., Ruppitsch W., Pietzka AT, Stöger A, Huhulescu S, Heuberger S, Pichler J, Much P, Pfaff G, Stark K, Prager R, Flieger A, Feenstra O, Ilerberger F., (2009) "Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese 'Quargel, Austria and Germany", 15(5)
34. Gahan C.G.M. e Hill C. (1999) "The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*". J. Bacteriol., 180, 3650-3656.

35. Gandhi M., Chikindas M.L. (2007) “*Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive”. *Int. J. Food Microbiol.*, 113, 1-15.
36. Gendel S.M. (2004) “Riboprint analysis of *Listeria monocytogenes* isolates obtained by FDA from 1999 to 2003”. *Food Microbiol.*, 21, 187-191.
37. Germini A., Masola A., Carnevali P., Marchelli R. (2009) “Simultaneous detection of *Escherichia coli* O175:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR”. *Food Control* 20 (2009) 733–738.
38. Giaccone V. (2005) “Psicrotrofia dei principali agenti di malattia alimentare”. Atti Conferenza nazionale “la sicurezza microbiologica nella produzione di alimenti per il 21° secolo. Microbiologia degli alimenti conservati in stato di refrigerazione” Bologna, 3 maggio 2005, 9-24.
39. 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.
40. Gohil V.S., Ahmad M.A., Davis R. e Bobinson R.K. (1995) “Incidence of *Listeria* spp. in retail foods in the United Arab Emirates”. *J. Food prot.*, 58, 102-104.
41. Goulet V., Jacquet C., Martin P. et al. (2006) “Surveillance of human listeriosis in France, 2001-2003”. *Euro Surveill.*, 11, 79-81.
42. Gray M.J., Zadoks R.N., Fortes E.D., Dogan B., Cai S., Chen Y.H., Scott V.N., Gombas D.E., Boor K.J., Wiedmann M. (2004). “*Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations”. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5833–5841.
43. Guerra M.M., McLauchlin J., Bernardo F.A. (2001) “*Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal”. *Food Microbiol.*, 18, 423-429.
44. Gillespie IA, Mook P, Little CL, Grant KA, McLauchlin J.(2010) “Human listeriosis in England”, 2001–2007
45. Harwood J.L., Russel N.J. (1984) “Lipids in plants and microbes”. George Allen and Unwin, London.
46. Heir E., Lindstedt B.-A., Røtterud O.-J., Vardund T., Kapperud G., Nesbakken T. (2004). “Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections”. *Int. J. Food Microbiol.*, 96, 85-96.
47. Hitchins A.D. (1996) “Assessment of alimentary exposure to *L. monocytogenes*”. *Int. J. Food Microbiol.*, 30, 71-85.

- 48.Hitchins A.D., Whiting R.C. (2001) "Food-borne *Listeria monocytogenes* risk assessment". Food Additives and Contaminants, 18, 1108-1117.
- 49.Hof H. (2003) "History and epidemiology of listeriosis" FEMS Immunology and Microbiology, 35, 199-202.
- 50.Hof H., Rocourt J. (1992) "Is any strain of *Listeria monocytogenes* isolated detected in food a health risk?". Int. J. Food Microbiol., 16, 683-692.
- 51.Holah J.T., Taylor J.H., Dawson D.J., Hall K.E. (2002) "Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*". J. Appl. Microbiol., 92 (Suppl.), 111-120.
- 52.Holliday S.L., Adler B.B., Beuchat L.R. (2003) "Viability of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in butter, yellow fat spreads, and margarine as affected by temperature and physical abuse". Food Microbiol., 20, 159-168.
- 53.Holsinger V.H., Rajkowski K.T. e Stabel J.R. "Milk pasteurization and safety: a brief history and update". Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. (1997) 16(2), 441-451.
- 54.Hudson J.A., Mott S.J., De Lacy K.M. e Edridge A.L. (1992) "Incidence and coincidence of *Listeria* spp., motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* in ready-to-eat fleshfoods". Int. J. Food Microbiol., 16, 99-108.
- 55.Hugot J.P., Alberti C., Berrebi D., Bingen E., Cézard J.P. (2004) "Crohn's disease: the cold chain hypothesis". The Lancet, 362, 2012-2015.
- 56.Inoue S., Nakama A., Arai Y., Kokubo Y., Maruyama T., Saito A., Yoshida T., Terao M., Yamamoto S., Kumagai S. (2000) "Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan". Int. J. Food Microbiol., 59, 73-77.
- 57.Ivanek R., Gröhn Y.T., Wiedmann M. (2006) "*Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modelling." Foodborne Pathogenes and Disease. 3 (4), 319-335.
- 58.Jackson T.L., Eykyn S.J., Graham E.M., Stanford M.R. (2003) "Endogenous bacterial endophthalmitis: a 17-years prospective series and review of 267 reported cases". Survey of Ophtalmology, 48, 403-423.
- 59.Jacquet M.P., Catimel B., Brosch R., Buchrieser C., Dehaumont P., Goulet V., Lepoutre A, Veit P., Rocourt J. (1995) "Investigations related to the epidemic strain involved in the french listeriosis outbreak in 1992". Appl. Environm. Microbiol., 61, 2242-2246.

60. Jensen A. (1993) "Excretion of *L. monocytogenes* in faeces after listeriosis: rate, quantity and duration". *Med. Microbiol. Lett.*, 2, 176-182.
61. Kalmokoff M.L., Austin J.W., Wan X.D., Sanders G., Banerjee S., Farber J.M. (2001) "Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions". *J. Appl. Microbiol.*, 91, 725-734.
62. Kerr K.G., Kite P., Heritage J., Hawkey P.M. (1995) "Typing of epidemiologically associated environmental and clinical strains of *Listeria monocytogenes* by random amplification of polymorphic DNA". *J. Food Protect.*, 58, 609-613.
63. King T., Ferenci T., Szabo E.A. (2003) "The effect of growth atmosphere on the ability of *Listeria monocytogenes* to survive exposure to acid, proteolytic enzymes and bile salts". *Int. J. Food Microbiol.*, 84, 133-143.
64. 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.
65. Kozempel M.F., Annous, B.A., Cook R.D., Scullen O.J. e Whiting R.C. "Inactivation of microorganisms with microwaves at reduced temperatures". *J. Food Prot.*, 61(5) (1998), 582-585.
66. Kusumaningrum H.D., Riboldi G., Hazeleger W.C., Beumer R.R. (2003) "Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination of foods". *Int. J. Food Microbiol.*, 85, 227-236.
67. Kvistholm Jensen A, Ethelberg S, Smith B, Møller Nielsen E, Larsson J, Mølbak K, Christensen JJ, Kemp M. (2010) "Substantial increase in listeriosis, Denmark 2009", 2010;15(12)
68. Lanni L., Bossù.T., Di Giamberardino F., Di Sirio A., Condoleo R., Bragagnolo A. "*L. monocytogenes* nel contesto dei nuovi regolamenti comunitari", Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana –Roma
69. Lessing M.P.A., Curtis G.D.W., Bowler I.C.J., (1994) "*Listeria ivanovii* infection". *J. Infect.*, 29, 230-231.
70. Levré E. e Valentini P. (1998) "Effetto della cottura in forno a microonde su *Listeria monocytogenes* sperimentalmente addizionata ad alimenti carnei". *L'Igiene Moderna*, 109, 381-389.
71. Linnan M.J., Mascola L., Lou X.D., Goulet V., May S., Salminen C., Hird D.W., Yonekura M.L., Hayes P., Weaver R. (1988) "Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese". *New England J. of Medicine*, 319, 823-828.

- 72.Liu D. (2004) “*Listeria monocytogenes*: comparative interpretation of mouse virulence assay”. FEMS Microbiol. Lett., 233, 159-164.
- 73.Liu D. (2006) “Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. J. Med. Microbiol., 55, 645-659.
- 74.Lou Y., Yousef A.E. (1996) “Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses”. J. Food Protect., 59, 465-471.
- 75.Lourenço A., Neves E., Brito L. (2009) “Susceptibility of *Listeria monocytogenes* from traditional cheese-dairies to in-use sanitizers”. Food Control 20, 585–589.
- 76.Lundén J., Autio T., Markkula A., Hellström S., Korkeala H. (2003) “Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants”. Int. J. Food Microbiol., 82, 265-272.
- 77.Lundén J., Tolvanen R., Korkeala H. (2008). ”Acid and heat tolerance of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* food plant strains”. Lett. Appl. Microbiol. 46, 276–280.
- 78.Luukkonen J., Kemppinen A., Kärki M., Laitinen H., Mäki M., Sivelä S., Taimisto A.-M., Ryhänen E.-L. (2005) “The effect of a protective culture and exclusion of nitrate on the survival of enterohemorrhagic *E. coli* and *Listeria* in Edam cheese made from Finnish organic milk”. Int. Dairy J., 15, 449-457.
- 79.Madden R.H., Murray K.A., Gilmore A. (2006) “Carriage of four bacterial pathogens by beef cattle in Northern Ireland at time of slaughter”. Lett. Appl. Microbiol., 44, 115-119.
- 80.Mahoney M. Henriksson A. (2003) “The effect of processed meat and meat starter cultures on gastrointestinal colonization and virulence of *L. monocytogenes* in mice”. Int. J. Food Microbiol., 84, 255-261.
- 81.Majjala R., Lyytikäinen O., Johansson T., Autio T., Aalto T., Haavisto L., Honkanen-Buzalski T. (2001) “Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland”. Int. J. Food Microbiol., 70, 97-109.
- 82.Makino S.-I., Kawamoto K., Takeshi K., Okada Y., Yamasaki M., Yamamoto S., Igimi S. (2005) “An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001”. Int. J. Food Microbiol., 104, 189-196.
- 83.Manfreda G., De Cesare A., Stella S., Cozzi M., Cantoni C. (2005) “Occurrence and ribotypes of *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheeses”. Int. J. Food Microbiol., 102, 287-293.

84. Manfredi R., De Ruvo N., Vivarelli M., Bellusci R., Montalti R., Attard L., Calza L., Cavallari A. (2003) "Sepsis and pleural effusion due to a multiresistant *Listeria monocytogenes* strain after an orthotopic liver transplantation". *Médecin et Maladies Infectieuses*, 33, 274-275.
85. Martinez I., Rørvik L.-M., Brox V., Lassen J., Seppola M., Gram L., Fønnesbech-Vogel B. (2003) "Genetic variability among isolates of *Listeria monocytogenes* from food products, clinical samples and processing environments, estimated by RAPD typing". *Int. J. Food Microbiol.*, 84, 285-297.
86. Mastronicolis S.K., Boura A., Karaliota A., Magiatis P., Arvanitis N., Litos C., Tsakirakis A., Paraskevas P., Moustaka H., Heropolulos G. (2006) "Effect of cold temperature on the composition of different lipid classes of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*: focus on neutral lipids". *Food Microbiol.*, 23, 184-194.
87. Mayrhofer S., Paulsen P., Smulders F.J., Hilbert F. (2004) "Antimicrobial resistance profile of five major foodborne pathogens isolated from beef, pork and poultry". *Int. J. Food Microbiol.*, 97, 23-29.
88. McDonnell G., Russell A.D. (1999) "Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance". *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 147-179.
89. McLauchlin J. (1996) "The relationship between *Listeria* and listeriosis". *Food Control*, 7 (4/5), 187-193.
90. 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.
91. Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCraig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V. (1999) "Food-related illness and death in the United States". *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 607-625.
92. Mendez-Hernandez C., Garcia-Feijoo J., Garcia-Sanchez J. (2004) "*Listeria monocytogenes*-induced endogenous endophthalmitis: bioultrasonic findings". *Am. J. Ophthalmol.*, 137, 579-581.
93. Mereghetti L., Quentin R., Van der Mee-Marquet N., Audurier A. (2000) "Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds". *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 5083-5086.
94. Midelet, G., Carpentier, B., 2002. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4015-4024.
95. Mook P., Grant KA., Little CL., Kafatos G., Gillespie IA. (2010) "Emergence of pregnancy-related listeriosis amongst ethnic minorities in England and Wales. *Euro Surveill*", 15(27)

- 96.Moorhead S.M., Dykes G.A. (2003) "Influence of the sigB gene on the cold stress survival and subsequent recovery of two *L. monocytogenes* serotypes". Int. J. Food Microbiol., in press.
- 97.Moroni P., Pisoni G., Ruffo G., Boettcher P.J. (2005) "Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic cell counts in italian dairy goats". Prev. Vet. Med., 69, 163-173.
- 98.Morosi S., Francisci D., Balzelli F. (2005) "A case of rhomboencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* successfully treated with linezolid". J. of Infection, xx, xxx-xxx.
- 99.Murray E.G.D., Webb R.A., Swann M.B.R. (1926) "A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (sp. nov.)". J. Pathol. Microbiol., 29, 407-439.
- 100.Nicholson F.A., Groves S.J., Chambers B.J. (2004) "Pathogen survival during livestock manure storage and following land application". Bioresource Technology 96, 135-143.
- 101.Nieto-Lozano J.C., Reguera-Useros J.I., Peláez-Martínez M. del C., Ardisson de la Torre A. (2006) "Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat". Meat Science, 72, 57-61.
- 102.Nightingale K.K., Schukken Y.H., Nightingale C.R., Fortes E.D., Ho A.J., Her Z., Grohn Y.T., McDonough P.L., Wiedmann M. (2004) "Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment". Appl. Environm. Microbiol., 70, 4458-4467.
- 103.Nørrung B., Andersen J.K., Schlundt J. (1999) "Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark". Int. J. Food Microbiol., 53, 195-203.
- 104.Nørrung B., Buncic S. (2008) "Microbial safety of meat in the European Union". Meat Science, 78, 14-24.
- 105.Nuvoloni R., Pedonese F., D'Ascenzi C., Rindi S., (2006), "la valutazione del rischio di *L. monocytogenes* in alimenti pronti pre il consumo" Annali della facoltà di Medicina Veterinaria di Pisa, Volume LIX
- 106.Nyati H. (2000) "An evaluation of the effect of storage and processing temperatures on the microbiological status of *sous vide* extended shelf-life products". Food Control, 11, 471-476.
- 107.Okutami A., Okada Y., Yamamoto S., Igimi S. (2004) "Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan". Int. J. Food Microbiol., 93, 131-140.

108. Okwumabua O., O'Connor M., Shull E., Strelow K., Hamacher M., Kurzynski T., Warshauer D. (2005) "Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from food animal clinical cases: PFGE pattern similarity to strains from human listeriosis cases". *FEMS Microbiol. Lett.*, 249, 275-281.
109. Olier M., Rousseaux S., Piveteau P., Lemaitre J.P., Rousset A., Guzzo J. (2004) "Screening of glutamate decarboxylase activity and bile salts resistance of human asymptomatic carriage, clinical, food and environmental isolates of *Listeria monocytogenes*". *Int. J. Food Microbiol.*, 93, 87-99.
110. Orriss G. D. e Whitehead A. J. (2000) "Hazard analysis and critical control point (HACCP) as a part of an overall quality assurance system in international food trade". *Food Control*, 11 (5), 345-351.
111. Özdemir H., Yıldırım Y., Küplülü Ö., Koluman A., Göncüoğlu M., İnat G. (2006) "Effects of lactic acid and hot water treatments on *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* on beef". *Food Control*, 17, 299-303.
112. Pak S.I., Spahr U., Jemmi T., Salman M.D. (2002) "Risk factors for *Listeria monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland, 1990-1999". *Prev. Vet. Med.*, 53, 55-65.
113. Pintado C.M.B.S., Oliveira A., Pampulha M.E., Ferreira M.A.S.S. (2005) "Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese". *Food Microbiol.*, 22, 79-85.
114. Pirie J.H.H. (1940) "*Listeria*: change of name for a genus of bacteria". *Nature*, 145, 264.
115. Prazak M.A., Murano E.A., Mercato I., Acuff G.R. (2002) "Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from various cabbage farms and packing sheds in -Texas". *J. Food Protect.*, 65, 1796-1799.
116. Raybourne R.B. (2002) "Virulence testing of *L. monocytogenes*". *J. AOAC Int.*, 85 (2), 516-523.
117. Reiss H.J., Potel J., Krebs H. (1951) "Granulomatosis infantiseptica. Eine Allgemeininfektion bei Neugeborenen und Säuglingen mit miliaren Granulomen". *Z. Ges. Inn. Med.*, 6, 451-457.
118. Rettally C.A., Speeg K.V. (2003) "Infection with *Listeria monocytogenes* following orthotopic liver transplantation: case report and review of the literature". *Transplantation Proceedings*, 35, 1485-1487.
119. Rhoades J.R., Duffy G., Koutsoumanis K. (2008) "Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review". *Food Microbiology* in press.

120. Rocourt J., Jacquet Ch., Reilly A. (2000) "Epidemiology of human listeriosis and seafoods". *Int. J. Food Microbiol.*, 62, 197-209.
121. Rocourt J., Schrettenbrunner A., Hof H., Espaze E.P. (1987) "Une nouvelle espèce du genre *Listeria*: *Listeria seeligeri*". *Pathol. Biol.*, 35, 1075-1080.
122. Rocourt J., Schrettenbrunner A., Seeliger H.P.K. (1983) "Differentiation biochimique des grouper génomiques de *Listeria monocytogenes* (sensu lato)". *Ann. Microbiol.*, 134 A, 65-71.
123. Rodríguez E., Calzada J., Arqués J.L., Rodríguez J.M., Nuñez M., Medina M. (2005) "Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese". *Int. Dairy J.*, 15, 51-57.
124. Rogga K.J., Samelis J., Kakouri A., Katsiari M.C., Savvaidis I.N., Kontominas M.G. (2005) "Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4° and 12°C". *Int. Dairy J.*, 15, 59-67.
125. Rohde H., Horstkotte M.A., Loeper S., Aberle J., Jenicke L., Lampidis R., Mack D. (2004) "Recurrent *Listeria monocytogenes* aortic graft infection: confirmation of relapse by molecular subtyping". *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 48, 63-67.
126. Romanova N., Favrin S., Griffiths M.W. (2002) "Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to sanitizers used in the meat processing industry". *Appl. Environm. Microbiol.*, 68, 6405-6409.
127. Ross T., Rasmussen S., Fazil A., Paoli G., Sumner J. (2009) "Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meats in Australia". *International Journal of Food Microbiology* 131 (2009) 128–137.
128. Ryser E.T. (1999). Foodborne listeriosis, In: Ryser, E.T., Marth, E.H. (Eds.), *Listeria*, Listeriosis and Food Safety, Second Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, NY, pp. 299-358.
129. Salamina G., Dalle Donne E., Niccolini A., Poda G., Cesaroni D., Bucci M., Fini R., Maldini M., Schuchat A., Swaminathan B., Bibb W., Rocourt J., Binkin N., Salmaso S. (1996) "A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*". *Epidemiol. & Infect.*, 117(3), 429-436.
130. Scanga J.A., Grona A.D., Belk K.E., Sofos J.N., Bellinger G.R., Smith G.C. (2000) "Microbiological contamination of raw beef trimmings and grownd beef". *Meat Science* 56, 145-152.
131. Schlech W.F., Lavigne P.M., Bortolussi R.A., Allen A.C., Haldane E.V., Wort A.J., Hightower A.W., Johnson S.E., King S.H., Nicholls E.S., Broome C.V. (1983) "Epidemic listeriosis: evidence for trasmission by food". *New Eng. J. Med.*, 308, 203-206.

132. Seeliger H.P.K. (1961) "Listeriosis". Karger Verlag, Basel.
133. Sheridan J.J., Duffy G., McDowel D.A., Blair I.S. (1994) "The occurrence and initial number of *Listeria* in Irish meat and fish products and the recovery of injured cells from frozen products". Int. J. Food Microbiol., 22,105-113.
134. Sheridan J.J., Duffy G., McDowel D.A., Blair I.S. (1997) "Development of a surface adhesion immunofluorescent technique for the rapid isolation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat". J. Appl. Microbiol., 82,225-232.
135. Siegman-Igra Y., Levin R., Weinberger M., Golan Y., Schwartz D., Samra Z., Konigsberger H., Yinnon A., Rahava G., Keller N., Bisharat N., Karpuch J., Finkelstein R., Alkan M., Landau Z., Novikov J., Hassin D., Rudnick C., Kitzes R., Ovaia Sh. Chimoni Z., Lang R., Shohat T. (2002) "*L. monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide". Emerg. Infect. Dis., 8 (3), 305-310.
136. Siegman-Igra Y., Levin R., Weinberger M., Golan Y., Schwartz D., Samra Z., Konigsberger H., Yinnon A., Rahava G., Keller N., Bisharat N., Karpuch J., Finkelstein R., Alkan M., Landau Z., Novikov J., Hassin D., Rudnick C., Kitzes R., Ovaia Sh. Chimoni Z., Lang R., Shohat T. (2002) "*L. monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide". Emerg. Infect. Dis., 8 (3), 305-310.
137. Skovgaard N., Morgen C.A. (1988) "Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds and in raw foods of animal origin". Int. J. Food Microbiol., 6, 229-242.
138. Smerdon W.J., Jones R., McLaughlin J., Reacher M. (2001) "Surveillance of listeriosis in England and Wales 1995-1999". Commun. Dis. Public Health 4, 188-193.
139. Smiatacz T., Kowalik M.M., Hlebowicz M. (2005) "Prolonged dysphagia due to *Listeria*-rhombencephalitis with brainstem abscess and acute polyradiculomeuritis". J. of Infection., xx, 1-3.
140. Soncini G., Valnegri L. (2005) "Analysis of bulk goats' milk and milk-filters from Valtellina and Valchiavenna (Lombardy Prealps) for the presence of *Listeria* species". Small Ruminant Res., 58, 143-147.
141. Swaminathan B. (2001). "*Listeria monocytogenes*". In M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville (Eds.) "Food microbiology fundamentals and frontiers" (2nd ed., pp. 383-409). Washington, DC: ASM Press.
142. Takahashi T., Ochiai Y., Matsudate H., Hasegawua K., Segawa T., Fukuda M., Hondo R., Ueda F. (2007) "Isolation of *Listeria monocytogenes* from the skin of slaughtered cattle". Journal of Veterinary Medical Science, 69 (10) 1077-1079.
143. Tauxe R.V. (2002) "Surveillance and investigation on foodborne diseases; roles for public health in meeting objectives for food safety". Food Control, 13, 363-369. .

144. Teixeira de Carvalho A.A., Aparecida de Paula R., Mantovani H.C., Alencar de Moraes C. (2006) "Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami". *Food Microbiol.*, 23, 213-219.
145. Thunberg R.L., Tran T.T., Bennett R.W., Matthews R.N., Belay N. (2002) "Microbial evaluation of selected fresh produce obtained at retail markets". *J. Food Protect.*, 65, 677-682.
146. To M.S., Favrin S., Romanova N., Griffiths M.W. (2002) "Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*". *Appl. Environm. Microbiol.*, 68, 5258-5264.
147. Trussel M. (1989) "The occurrence of *Listeria* in production of processed meat, salami and mettwurst". *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 131, 409-412.
148. Unnertad H., Romell A., Ericsson H., Danielsson-Tham M.L., Tham W. (2000) "*Listeria monocytogenes* in faeces from clinically healthy dairy cows in Sweden". *Acta Veterinaria Scandinava*, 41, 167-171.
149. Uyttendaele M., De Troy P., Debevere J. (1999) "Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market". *Int. J. Food Microbiol.*, 53, 75-80.
150. Van Coillie E., Werbrouck H., Heindrickx M., Herman L., Rijpens N. (2004) "Prevalence and typing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products on the Belgian market". *Journal of Food Protection*, 67 (119), 2480-2487.
151. Vásquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., González-Zonr B., Wehland J., Kreft J. (2001) "*L. monocytogenes* pathogenesis and molecular virulence determinants". *Clin. Microbiol. Rev.*, 14(3), 584-640.
152. Vialette M., Pinon A., Chasseignaux E., Lange M. (2003) "Growth kinetic comparison of clinical and seafood *Listeria monocytogenes* isolates in acid and osmotic environment". *Int. J. Food Microbiol.*, 82, 121-131.
153. Vines A., Swaminathan B. (1997) "Nucleotide sequence analysis of two virulence-associated genes in *L. monocytogenes* serotype 1/2b and comparison with the same genes in other serotypes important in human disease". *Lett. Appl. Microbiol.*, 24, 166-168.
154. Walsh D., Duffy G., Sheridan J.J., Blair I.S., McDowell D.A. (2001) "Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes* in retail foods". *J. Appl. Microbiol.*, 90, 517-522.
155. Wirtanen G., Salo S. (2003) "Disinfection in food processing – Efficacy testing disinfectants". *Rev. Environm. Sci. Biotechnol.*, 2, 293-306.

156. Yde M, Botteldoorn N, Bertrand S, Collard JM, Dierick K. (2010) “Microbiological and molecular investigation of an increase of human listeriosis in Belgium”, 2006-2007,15(6)
157. Zivkovic J., Miokovic B. e Njari B. (1998) “Occurrence and control of *Listeria* spp. in ready-cooked meals prepared with chicken meat”. Fleischwirtschaft, 798-800.

SITI WEB

<http://www.who.int/csr/en/> (WHO: World Health Organization)

<http://www.fda.gov/> (FDA: Food and Drug Administration)

<http://www.cbc.ca/news/>

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/> (MedlinePlus)

<http://www.fsis.usda.gov/> (Food Safety and Inspection Service: FSIS)

<http://www.pasteur.fr/> (CNR à l'Institut Pasteur)

<http://www.epicentro.iss.it/> (Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute)

<http://www.iss.it/> (Istituto Superiore di Sanità)

<http://www.gazzettaufficiale.it/>

RINGRAZIAMENTI

Un particolare ringraziamento al Chiarissimo Professore Valerio Giaccone che con la sua totale dedizione alla medicina veterinaria e con speciale competenza professionale, mi ha comunicato passione nei confronti dello studio contribuendo alla formazione della mia personalità, allargando i miei orizzonti del sapere e facendomi consapevole dell'esistenza in me di talenti che non pensavo di possedere. Grazie, Professore.

Questa tesi la dedico alla mia famiglia, che seppur con innumerevoli difficoltà, mi ha sostenuto ed accompagnato al traguardo.

Ringrazio inoltre la Dott.ssa Daniela Pasotto per la sua disponibilità e per avermi fatto partecipe della sua scienza.

Un grazie particolare a Riccardo, per avermi aiutato con la tesi, riuscendo, impresa non facile per chi mi conosce, ad incrementare la stima in me stessa.

Voglio ringraziare di cuore e con un immenso affetto i miei amici che, con tanta pazienza e amore, mi hanno sostenuto nei momenti di sconforto e non solo; a loro auguro di poter raggiungere la propria meta e di affrontare con coraggio le difficoltà della vita e di poter godere fino in fondo dei piccoli piaceri che essa offrirà a loro. ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ' (grazie)