



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e  
Ambiente

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

Controllo di *Listeria monocytogenes* negli alimenti “ready to eat”  
mediante l’applicazione di batteriocine

Relatore  
Prof. Alessio Giacomini

Laureando  
Nicola Bazzacco  
Matricola n. 1192201

ANNO ACCADEMICO  
2021/2022

# Riassunto

La listeriosi, patologia provocata dal batterio *Listeria monocytogenes*, rappresenta attualmente la principale zoonosi in Europa per numero di morti e tasso di ospedalizzazione, si tratta di una tossinfezione alimentare che si manifesta in seguito all'ingestione di alimenti contaminati.

Il fatto che gli alimenti maggiormente implicati nei casi di listeriosi appartengono alla categoria degli alimenti pronti per il consumo, definiti "ready to eat", in particolare quelli refrigerati, la diffusione relativamente elevata del batterio in vari ambienti, soprattutto quelli di trasformazione dell'industria alimentare, e l'incremento dei trend di consumo di tali alimenti, che rappresentano sempre più una parte della comune dieta della maggior parte dei consumatori, fondano le basi per migliorare le strategie di controllo del patogeno nei substrati alimentari che ne favoriscono la crescita.

Una tecnica efficace risulta l'impiego di particolari metaboliti batterici, ovvero le batteriocine, che applicate con varie tecniche agli alimenti, sono in grado di inibire la crescita del patogeno grazie alle loro proprietà anti-*Listeria*.

La loro efficacia risulta ampiamente dimostrata quando vengono applicate, durante il processo produttivo, tramite i surnatanti privi di cellule dei batteri produttori o l'impiego di concentrati purificati. Diversamente, l'utilizzo dei colture protettive risulta di scarso interesse in quanto la conservazione in refrigerazione rallenta lo sviluppo di batteri lattici con conseguente inibizione della loro produzione di batteriocine.

# Abstract

Listeriosis, a disease caused by the bacterium *Listeria monocytogenes*, is currently the main zoonosis in Europe for the number of deaths and hospitalization rate, it is a foodborne toxin that is manifested by the ingestion of contaminated food.

The fact that foods most affected by listeriosis belong to the category of ready-to-eat foods, defined as "ready-to-eat", in particular chilled foods, the relatively high spread of the bacterium in various environments, especially the processing of the food industry, and the increase in consumption trends for these foods, which increasingly represent a part of the common diet of most consumers, They lay the foundations for improving pathogen control strategies in food substrates that promote growth.

An effective technique is the use of particular bacterial metabolites, or the bacteriocins, which applied with various techniques to food, are able to inhibit the growth of the pathogen thanks to their anti-*Listeria* properties.

Their effectiveness is amply demonstrated when they are applied, during the production process, through the cell-free supernatants of the producing bacteria or the use of purified concentrates. Otherwise, the use of protective cultures is of little interest as the storage in refrigeration slows the development of lactic acid bacteria resulting in the inhibition of their production of bacteriocins.

# INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....</b>                      | <b>1</b>  |
| 1.1 Cenni storici e classificazione.....                           | 1         |
| 1.2 Caratteristiche morfologiche.....                              | 2         |
| 1.3 Ecologia.....  | 3         |
| 1.4 Diffusione e fonti di contaminazione primaria.....             | 4         |
| 1.5 Contaminazione secondaria e biofilm.....                       | 5         |
| 1.6 Listeriosi.....  | 7         |
| 1.7 Aspetti epidemiologici .....                                   | 8         |
| <b>2. Alimenti ready to eat.....</b>                               | <b>12</b> |
| 2.1 Generalità.....  | 12        |
| 2.2 Aspetti di sicurezza microbiologica .....                      | 13        |
| 2.3 Aspetti legislativi.....                                       | 14        |
| <b>3. Batteriocine .....</b>                                       | <b>15</b> |
| 3.1 Caratteristiche generali .....                                 | 15        |
| 3.2 Classificazione .....  | 16        |
| 3.2.1 Lantibiotici .....   | 16        |
| 3.2.1.1 Focus sulla nisina .....                                   | 17        |
| 3.2.2 Batteriocine di classe II .....                              | 19        |
| 3.2.3 Batteriocine di classe III.....                              | 20        |
| 3.2.4 Batteriocine di classe IV.....                               | 20        |
| <b>4. Applicazione delle batteriocine negli alimenti RTE .....</b> | <b>21</b> |
| 4.1 Inibizione della crescita di <i>L. monocytogenes</i> .....     | 21        |
| 4.2 Metodi di applicazione delle batteriocine .....                | 22        |
| 4.2.1 Colture protettive .....                                     | 22        |
| 4.2.2 Applicazione di surnatanti batterici privi di cellule.....   | 24        |
| 4.2.3 Applicazione di batteriocine purificate.....                 | 28        |
| <b>5. Conclusioni.....</b>   | <b>32</b> |

# 1. *Listeria monocytogenes*

## 1.1 Cenni storici e classificazione

Le prime osservazioni del batterio *Listeria monocytogenes* risalgono alla fine dell'Ottocento da parte di alcuni studiosi in Francia e Germania, che osservano la presenza di batteri gram positivi in pazienti deceduti da una patologia di origine batterica.

La prima relazione ufficiale venne pubblicata nel 1926, dopo l'isolamento del batterio dal fegato e sangue di conigli e cavie da laboratorio, da parte dello studioso Murray. La caratteristica più importante che gli studiosi osservarono era la notevole capacità del batterio di far produrre nelle cavie da laboratorio una notevole quantità di monociti. In seguito, il nome del batterio fu dedicato al chirurgo britannico Joseph Lister.

Solamente tra gli anni Cinquanta e Settanta la patologia provocata dal batterio fu riconosciuta di origine alimentare.

Dagli anni Ottanta il susseguirsi di varie epidemie di listeriosi suscitò notevole interesse tra studiosi e autorità di sanità pubblica, infatti, nel 1983 in Francia, Rocourt riuscì ad isolare e caratterizzare la specie *monocytogenes*, responsabile della patologia nell'uomo.

È importante sottolineare che questo è stato possibile grazie ai miglioramenti nel campo nella genetica e biochimica, che negli anni Ottanta iniziarono a diffondersi rapidamente, passò quasi un secolo dalle prime osservazioni documentate del batterio all'identificazione della specie.

Attualmente al genere *Listeria* sono riconosciute 17 specie, tra cui *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* (*subsp. ivanovii* e *subsp. londoniensis*), *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae* e *L. newyorkensis*. Di queste solo le specie *monocytogenes* e *ivanovii* sono ritenute patogene, delle quali la prima è la più importante in quanto responsabile della listeriosi in molte specie animali compreso l'uomo.

*L. monocytogenes* presenta 15 antigeni somatici O e 4 antigeni flagellari H, grazie alla sierotipizzazione che sfrutta le reazioni antigene-anticorpo è stato possibile identificare in questa specie 13 sierotipi (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7) e grazie a studi basati su PCR è stato possibile ricondurre oltre il 95 % dei casi di patologia a 4 sierotipi (1/2a, 1/2b, 1/2c e b4).

## 1.2 Caratteristiche morfologiche

*Listeria monocytogenes* è un batterio di forma bastoncellare, le dimensioni medie sono di 0,5 µm di diametro e 1-2 µm di lunghezza. Questa specie batterica è caratterizzata dal fenomeno denominato pleomorfismo, in quanto le singole cellule possono aggregarsi in forme filamentose, fino a raggiungere lunghezze di 100 µm, soprattutto nelle colture più vecchie, con l'osservazione frequente di forme coccoidi, che si possono confondere con streptococchi.

Queste caratteristiche evidenziano come la classica forma a bastoncino non sia una caratteristica universale della specie, ma il fatto che durante la vita delle cellule possa mutare e quindi in alcuni stadi di crescita il batterio osservato al microscopio non possiede una morfologia a bastoncino, ma una forma intermedia a quella di un cocco, ovvero un coccobacillo.

*L. monocytogenes* è un gram positivo, asporigeno, non capsulato, catalasi positivo, ossidasi negativo, patogeno intracellulare facoltativo, aerobio o anaerobio facoltativo. Presenta flagelli peritrichi, in genere 5-6, che permettono motilità di tipo rotatorio, la quale varia in funzione della temperatura ambientale. I flagelli vengono prodotti a temperature di 20-22 gradi centigradi, se superiori perde progressivamente la motilità, fino a divenire immobile a partire da 37 gradi centigradi, in un terreno di coltura semisolido con la coltura batterica incubata a 20 gradi centigradi si può apprezzare il movimento, in quanto la colonia presenta un aspetto ad ombrello.

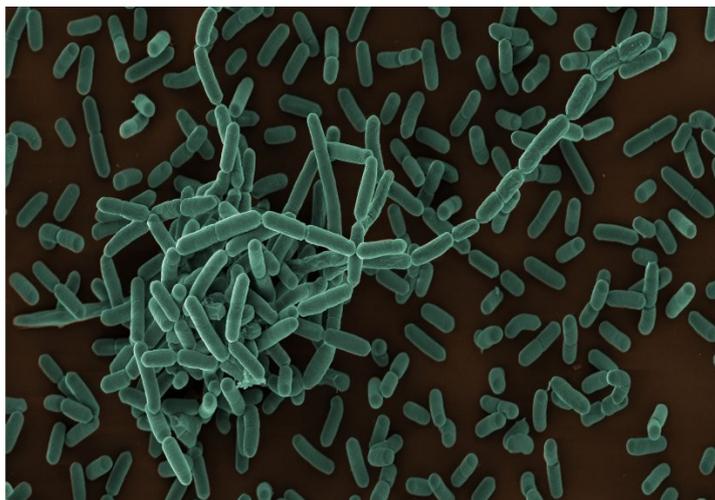


Figura 1.1. Cellule di *Listeria monocytogenes*. Si osserva la presenza simultanea di forme bastoncellari, coccoidi, e intermedie (coccobacilli), come pure cellule unite in catene. Scansione al microscopio elettronico.

## 1.3 Ecologia

Essendo *Listeria monocytogenes* un patogeno alimentare è di fondamentale importanza conoscere i parametri intrinseci ed estrinseci che ne favoriscono la crescita e lo sviluppo negli alimenti, in quanto le condizioni di ogni substrato alimentare sono decisive nel determinarne la sua evoluzione nel tempo. Gli obiettivi di bloccare la crescita e di diminuire la concentrazione cellulare di *L. monocytogenes* in un alimento sono quindi strettamente dipendenti da alcuni fattori che verranno in seguito analizzati.

*L. monocytogenes* è un batterio mesofilo con spiccate tendenze psicrotrofe, infatti la temperatura cardinale minima risulta di  $-1,5^{\circ}\text{C}$  e quella cardinale massima pari a  $45^{\circ}\text{C}$ . Il tempo di generazione alla temperatura ottimale di crescita, pari a  $37^{\circ}\text{C}$ , è di circa 30 minuti, mentre a  $4^{\circ}\text{C}$  risulta compreso tra 13 e 25 ore. La termoresistenza, rispetto ad altri patogeni alimentari non sporigeni, può ritenersi di una certa entità, sono necessari 15 secondi ad una temperatura di  $72^{\circ}\text{C}$  per effettuare una riduzione decimale del patogeno.

*L. monocytogenes* è in grado di crescere in ambienti con concentrazioni saline fino a circa il 10 % anche se la concentrazione ottimale è pari a 0,7 % e quella minima inferiore a 0,5 % mentre i valori di attività dell'acqua ( $a_w$ ) minimi risultano compresi tra 0,900 e 0,920.

È in grado di svilupparsi in un range di pH compreso tra 4,2 e 9,5. Valori superiori a 12 sono da ritenersi letali in quanto ne provocano la morte cellulare, mentre trova le condizioni ideali di sviluppo con valore pari a 7. La sensibilità del batterio ai valori di pH è correlata allo stadio di crescita, nella fase esponenziale risulta maggiormente sensibile, in quanto qualsiasi sollecitazione avversa ne può compromettere la sua sopravvivenza, quando si trova in fase stazionaria risulta molto più resistente.

In *L. monocytogenes* il potenziale redox dei substrati alimentari in cui si sviluppa non riveste particolare importanza, in quanto, come citato precedentemente si tratta di un batterio anaerobio e aerobio facoltativo; riesce quindi a svilupparsi sia in ambienti contenti ossigeno con potenziale positivo (respirazione aerobica) sia in situazioni in cui l'ambiente è ridotto (respirazione anaerobica o fermentazione). A parità di altre condizioni, è in grado di crescere negli alimenti conservati sottovuoto e in atmosfera protettiva.

## 1.4 Diffusione e fonti di contaminazione primaria

*Listeria monocytogenes* si può definire un batterio geofilo, infatti è in grado di sopravvivere e svilupparsi anche al di fuori dell'organismo degli animali, i quali rappresentano il principale serbatoio di diffusione (reservoir). Si tratta, inoltre, di un batterio ubiquitario, infatti è diffuso su un'ampia variabilità di ambienti, infatti, tramite il ciclo oro-fecale, può diffondersi e svilupparsi nelle acque superficiali, nel suolo, nei terreni coltivati, tramite i reflui zootecnici o l'eventuale utilizzo di acque per l'irrigazione contaminate, inoltre anche gli animali selvatici, come uccelli e roditori, possono contribuire alla diffusione del patogeno.

Anche se il genere *Listeria* era originariamente un batterio saprofita, alcune specie si sono adattate con successo a diverse nicchie ambientali associate ad attività umane, grazie alla capacità di percepire e rispondere allo stress ambientale. Questa tolleranza ha consentito al patogeno di passare dal cibo contaminato al tratto gastrointestinale dei mammiferi ospiti.

Negli animali la contaminazione avviene principalmente per l'ingestione di alimenti contaminati, in particolare, nei ruminanti, a causa degli insilati contaminati, in quanto una insufficiente acidificazione della biomassa da fermentare può costituire una nicchia ecologica ideale per *L. monocytogenes*. Le cause più comuni si riscontrano nella rottura del film plastico che dovrebbe impedire l'ingresso dell'ossigeno atmosferico o il compattamento non adeguato della biomassa con la presenza di una quantità di aria, e quindi anche di ossigeno, troppo elevata da non permettere una rapida crescita dei batteri anaerobi acidificanti.

Una volta che *L. monocytogenes* ha colonizzato il bovino e indotto la patologia, nel latte mastitico prodotto si riscontrano cariche di 200-20.000 cellule/ml, anche la fase di mungitura può rappresentare una fonte di contaminazione tramite le attrezzature infette.

Il patogeno si riscontra anche su prodotti ortofrutticoli freschi, soprattutto quando la parte edibile è a stretto contatto con il terreno, in quanto la presenza del batterio nel suolo può rapidamente passare sul vegetale, ad esempio a seguito delle gocce di pioggia che impattano sul terreno e ne sollevano piccole particelle che si depositano sulle parti vegetali, o l'irrigazione delle colture con acqua contaminata precedentemente, le parti che risultano maggiormente esposte alla contaminazione sono quelle più esterne, a diretto contatto con il terreno. La presenza di *L.*

*monocytogenes* si può riscontrare anche nei prodotti ittici e della pesca, quando si è in presenza di acque contaminate.

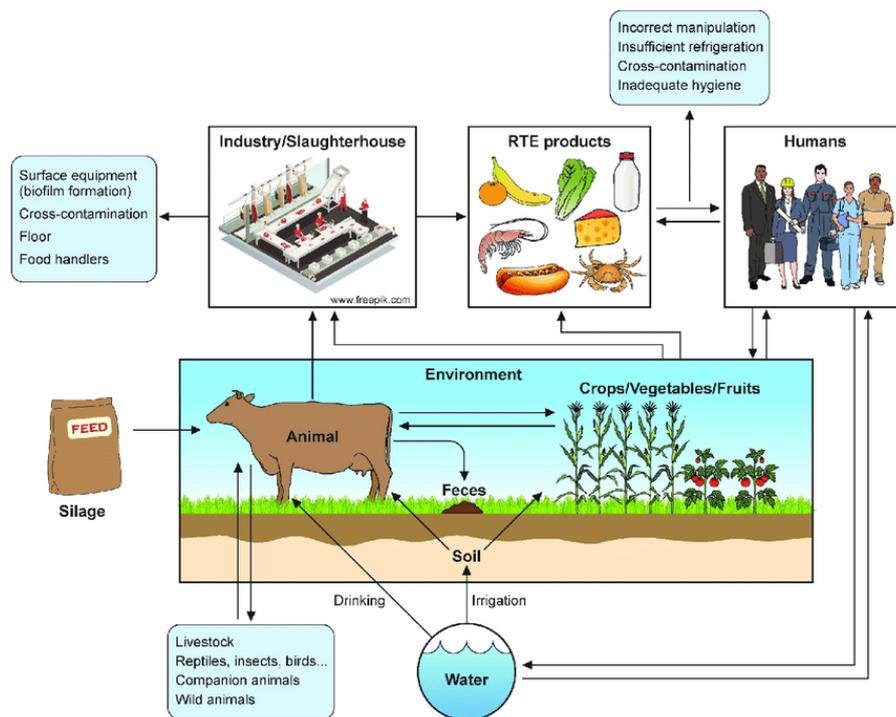


Figura 1.2. Fonti di contaminazione da *L. monocytogenes*. Scenari di trasmissione del batterio che rispecchiano la sua natura ubiquitaria e geofila e la presenza in molti ambienti naturali e antropici. (Juan et al., 2021).

## 1.5 Contaminazione secondaria e biofilm

Le spiccate capacità di *L. monocytogenes* nel formare biofilm risultano di importanza fondamentale nelle contaminazioni secondarie e terziarie, cioè tutti i casi in cui un ipotetico prodotto alimentare si contamina con il batterio nelle fasi di lavorazione post-primaria fino al confezionamento.

L'aggregazione in comunità cellulari e la notevole capacità di adattamento agli stress ambientali permette una maggiore resistenza a disinfettanti e agenti antimicrobici rispetto alla forma planctonica. È in grado di colonizzare zone difficilmente raggiungibili dai prodotti sanificanti, come crepe, irregolarità delle superfici e pavimenti, angoli e fondi ciechi delle attrezzature presenti nelle linee di lavorazione, che rappresentano delle nicchie ecologiche in cui il patogeno può sopravvivere e replicarsi, fungendo da reservoir per la sua diffusione dei prodotti alimentari. Risulta importante la contaminazione incrociata tra prodotto crudo e cotto, con riferimento all'industria di trasformazione dei prodotti di origine animale, come i macelli, i laboratori di sezionamento o di

lavorazione dei prodotti della pesca o l'industria lattiero casearia, in quanto la manipolazione degli alimenti già cotti con strumenti che sono stati precedentemente a contatto con l'alimento crudo, risulta determinante nella contaminazione.

Anche il personale stesso, se non segue le buone prassi di igiene, può rappresentare un ottimo vettore di contaminazione.

Uno studio ha analizzato la presenza qualitativa di *L. monocytogenes* in 71 campioni ambientali (superfici sporche e/o sanificate) e 16 campioni di alimenti (prodotti finiti, semilavorati, materie prime) raccolti in uno stabilimento che produce preparazioni gastronomiche, di cui 26 su 70 sono risultati positivi, mentre nei campioni di alimenti la prevalenza è stata pari a 18,7% (Cecchini et al. 2011); questo dimostra quanto il patogeno sia frequentemente presente negli ambienti di lavorazione, e la conseguente attenzione che gli OSA (operatori del settore alimentare) devono porre nella gestione delle procedure di pulizia e sanificazione degli ambienti. Inoltre, tra i campioni prelevati sono stati saggiati 31 ceppi di *L. monocytogenes* per valutare la capacità di formare biofilm di ogni singolo ceppo, nelle condizioni di crescita utilizzate nella sperimentazione il 77,4% si è comportato come un forte produttore (Cecchini et al. 2011).

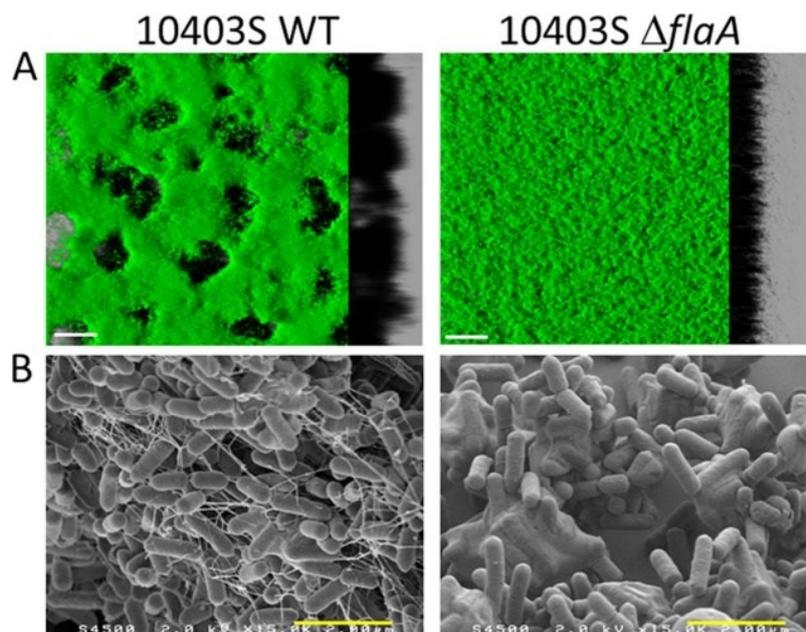


Figura 1.3. Osservazione al microscopio di biofilm di *L. monocytogenes*. Isosuperficie di immagini confocali tramite software IMARIS. (Morgan G. et al. 2015).

## 1.6 Listeriosi

La patologia provocata dal batterio *L. monocytogenes* viene denominata listeriosi. Si tratta di una tossinfezione alimentare, in quanto il batterio viene ingerito in seguito al consumo di alimenti contaminati, e successivamente si moltiplica e inizia il processo infettivo all'interno dell'organismo ospite. Le forme principali in cui può manifestarsi sono due, la forma non invasiva o diarroica e la forma invasiva o sistemica.

I sintomi della forma meno grave, non invasiva, comprendono febbre, dolori muscolari, diarrea, crampi addominali, spossatezza e nausea, caratteristici di molti focolai di gastroenterite da *Listeria* che si verificano prevalentemente in persone sane (Ooi e Lorber, 2005). Il periodo di incubazione medio è di 20-25 ore. Si tratta di una malattia autolimitante che porta i pazienti ad una guarigione senza cure e trattamenti antimicrobici (Dalton et al., 1997).

Nella forma invasiva il periodo di incubazione risulta più lungo, indicativamente di due o tre settimane, e include sintomi più gravi quali infezioni al sistema nervoso centrale, meningite, encefalite del tronco cerebrale e ascesso cerebrale. La maggior parte di questi casi si osserva in pazienti di età superiore ai 50 anni (Brouwer et al., 2006). Le infezioni sistemiche nascono dalla capacità del patogeno di passare dall'intestino al circolo sanguigno, in cui risultano più compromessi i soggetti fragili come donne in gravidanza, neonati, pazienti con sistema immunitario compromesso, anziani e diabetici.

*L. monocytogenes* ha la capacità di superare la placenta e provocare gravi danni al feto, se l'infezione avviene nei primi di gravidanza la patologia può portare ad aborto spontaneo del feto, se si verifica nell'ultimo trimestre prima del parto può essere causa di morte in utero o parto prematuro, a cui segue la morte del neonato per insufficienza multiorgano (Schlech 2000).

La dose infettante per le persone a rischio è notevolmente ridotta e si attesta a  $10^2$ - $10^3$  cellule, valori relativamente bassi da raggiungere anche per l'ingestione di alimenti con cariche basse, mentre nei soggetti sani i valori raggiungono ordini di grandezza di  $10^6$ - $10^9$  cellule.

Come si nota dall'immagine sottostante, la patogenicità di *L. monocytogenes* si esprime con la sua capacità di penetrare all'interno delle cellule dell'ospite, superando la barriera intestinale e gli anticorpi dell'organismo, è infatti in grado di sintetizzare una molteplicità di enzimi che permettono la lisi della membrana dei fagosomi in cui il batterio viene inizialmente intrappolato con lo scopo di

essere fagocitato e distrutto, e di produrre filamenti di actina che hanno lo scopo di attuare il passaggio da una cellula all'altra attuando così una sorta di ciclo di invasione cellulare.

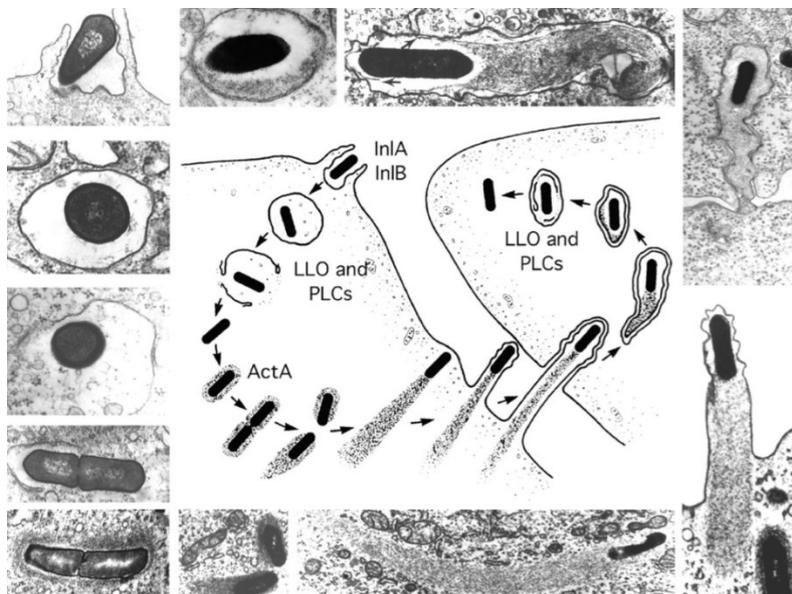


Figura 1.4. Fasi del ciclo intracellulare di *L. monocytogenes*. Grafico centrale: Fasi di ingresso della cellula, fuga dal vacuolo, nucleazione dell'actina, motilità e diffusione tra cellula-cellula mediata da actina. Micrografie elettroniche (esterno) rappresentative da cui deriva il grafico. ( Tilney e Portnoy 1989).

## 1.7 Aspetti epidemiologici

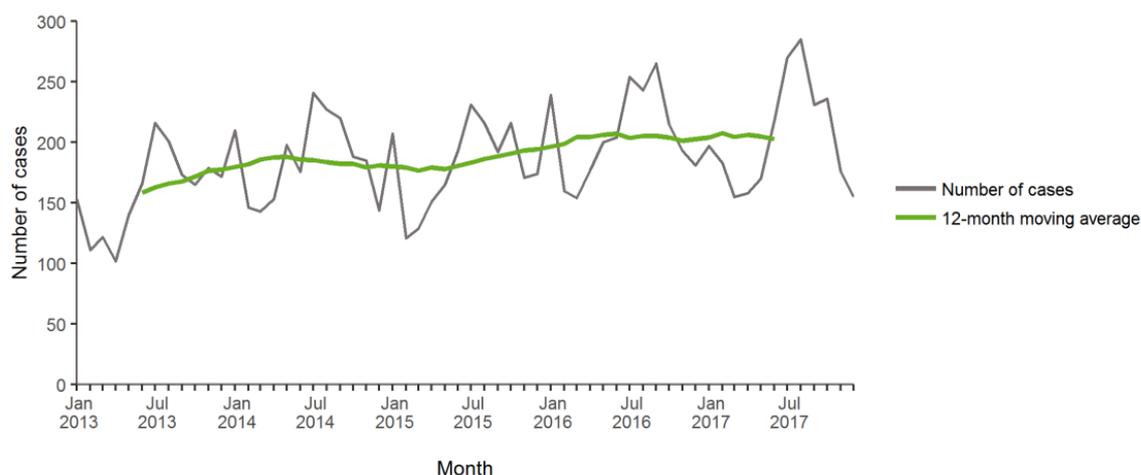
La listeriosi è definita dall'OMS come malattia a bassa incidenza, da 0,1 a 10 casi per milione di abitanti all'anno, a seconda dei paesi e delle regioni del mondo, secondo l'Istituto Superiore di Sanità, in Europa, negli anni 2000-2009 l'incidenza della forma di tipo invasivo era di circa 0,3 casi/100.00 abitanti.

Nonostante il numero di casi sia relativamente basso rispetto ad altre patologie alimentari, due parametri risultano determinanti nel considerarla un problema significativo per la salute pubblica, ovvero la letalità, mediamente del 20-40 % e il tasso di ospedalizzazione, maggiore del 90%.

In Italia, a partire dal 1996, i casi di listeriosi a notifica obbligatoria sono raccolti in una banca dati del Ministero della Salute, accanto a questo sistema informativo ufficiale è attualmente attiva una sorveglianza di laboratorio su base volontaria per la caratterizzazione sierologica e molecolare dei ceppi clinici, inclusa dal 2009 nel sistema ENTER-NET Italia della rete europea ENTER-NET (Enteric

pathogen Network) che fa parte del programma di sorveglianza per le food and water born diseases coordinato dall'ECDC (European Center for Disease Prevention and control).

I dati raccolti nei diversi anni di segnalazioni soprattutto in Europa, documentano una tendenza all'incremento dell'incidenza, seppure non marcata.



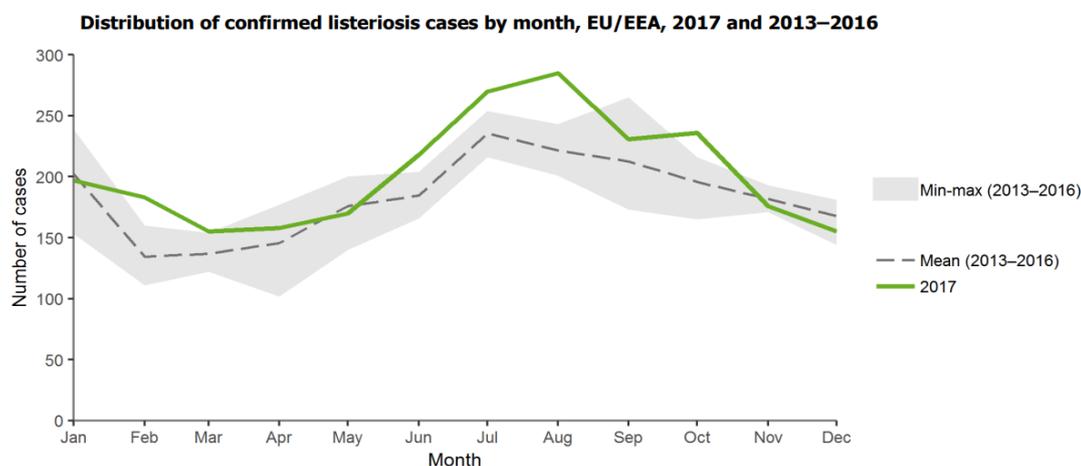
Source: Country reports from Austria, Belgium, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Malta, the Netherlands, Norway, Poland, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, and the United Kingdom.

Figura 1.5. Numero di casi di listeriosi mensili dei paesi sopra indicati nel periodo 2013-2017. Fonte: ECDS annual epidemiological report 2017

Un aspetto importante da analizzare risulta la distribuzione dei casi di listeriosi durante i vari mesi dell'anno, durante i mesi invernali il numero di casi raggiunge i minimi valori, evidentemente le condizioni invernali che comportano temperature ambientali più basse, nel caso in cui gli alimenti interessati non vengano conservati in refrigerazione; quindi, non rispettando la catena del freddo, rallentano la moltiplicazione del patogeno.

Nei mesi estivi osserviamo un aumento dei casi, a partire circa dal mese di maggio, e una decrescita dal mese di settembre, in concomitanza con l'inizio della stagione autunnale. Interessante il picco che viene raggiunto nel mese di agosto, evidentemente un ruolo fondamentale è dato dalle festività che comportano il consumo di cibi in gruppi di soggetti spesso all'aperto, data la stagione favorevole, e di conseguenza il maggior rischio che gli alimenti passino tempi relativamente lunghi fuori dalla catena del freddo, con l'aumento del tasso di crescita di *L. monocytogenes* qualora presente che si ripercuote nell'aumento della carica microbica dell'alimento stesso e quindi la probabilità che un ipotetico consumatore possa ingerire, con una porzione di alimento, un numero sufficiente di cellule corrispondente alla dose infettante. È inoltre consolidato che nei periodi festivi gli outbreak

alimentari raggiungono valori elevati in quanto il consumo di un singolo alimento da una molteplicità di soggetti, qualora contaminato, favorisca il dilagarsi di epidemie.



Source: Country reports from Austria, Belgium, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Malta, the Netherlands, Norway, Poland, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, and the United Kingdom.

Figura 1.7 Media dei casi mensili nel periodo 2013-2016 e casi del 2017. Notare l'aumento tra i mesi di maggio e settembre e il picco che viene raggiunto nei mesi estivi. (ECDC 2017).

Nel 2020, il report dell'EFSA ha evidenziato 1876 casi confermati di Listeriosi nell'uomo, di cui 780 ricoveri e 167 decessi. Il tasso di notifica nell'UE è di 0,42 per 100.000 abitanti mentre la letalità è pari al 13,0 % il che rende la listeriosi una delle malattie di origine alimentare più gravi sotto la sorveglianza dell'UE.

EU One Health Zoonoses Report 2020



Table 2: Reported hospitalisations and case fatalities due to zoonoses in confirmed human cases in the EU, 2020

| Disease                                  | Number of confirmed human cases | Hospitalisation      |                      |                                       |                             |                             | Deaths                |                       |                                       |                 |                   |
|--|---------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------------------|-----------------|-------------------|
|  |                                 | Status available (N) | Status available (%) | Number of reporting MS <sup>(a)</sup> | Reported hospitalised cases | Proportion hospitalised (%) | Outcome available (N) | Outcome available (%) | Number of reporting MS <sup>(b)</sup> | Reported deaths | Case fatality (%) |
| Campylobacteriosis                       | 120,946                         | 41,037               | 33.9                 | 14                                    | 8,605                       | 21.0                        | 83,744                | 69.2                  | 15                                    | 45              | 0.05              |
| Salmonellosis                            | 52,702                          | 20,562               | 39.0                 | 13                                    | 6,149                       | 29.9                        | 30,355                | 57.6                  | 15                                    | 57              | 0.19              |
| Yersiniosis                              | 5,668                           | 1,214                | 21.4                 | 12                                    | 353                         | 29.1                        | 3,072                 | 54.2                  | 13                                    | 2               | 0.07              |
| STEC infections                          | 4,446                           | 1,593                | 35.8                 | 16                                    | 652                         | 40.9                        | 3,094                 | 69.6                  | 19                                    | 13              | 0.42              |
| <b>Listeriosis</b>                       | 1,876                           | 803                  | 42.8                 | 18                                    | 780                         | <b>97.1</b>                 | 1,283                 | 68.4                  | 18                                    | <b>167</b>      | <b>13.0</b>       |
| Tularaemia                               | 641                             | 123                  | 19.2                 | 9                                     | 64                          | 52.0                        | 200                   | 31.2                  | 10                                    | 0               | 0                 |
| Echinococcosis                           | 488                             | 73                   | 15.0                 | 12                                    | 44                          | 60.3                        | 204                   | 41.8                  | 14                                    | 0               | 0                 |
| Q fever                                  | 523                             | NA                   | NA                   | NA                                    | NA                          | NA                          | 235                   | 44.9                  | 14                                    | 5               | 2.1               |
| West Nile virus infection <sup>(a)</sup> | 322                             | 239                  | 74.2                 | 8                                     | 219                         | 91.6                        | 322                   | 100                   | 8                                     | 39              | 12.1              |
| Brucellosis                              | 128                             | 56                   | 43.8                 | 8                                     | 36                          | 64.3                        | 55                    | 43.0                  | 9                                     | 2               | 3.6               |
| Trichinellosis                           | 117                             | 22                   | 18.8                 | 5                                     | 16                          | 72.7                        | 24                    | 20.5                  | 6                                     | 0               | 0                 |
| Rabies                                   | 0                               | NA                   | NA                   | NA                                    | NA                          | NA                          | NA                    | NA                    | NA                                    | NA              | NA                |

MS: Member State(s); NA: Not applicable, as information is not collected for this disease.

(a): Locally acquired infections – for West Nile virus infection, the total number of cases was used (includes probable and confirmed cases).

(b): Not all countries observed cases for all diseases.

Figura 1.8. Zoonosi riportate nel 2020. Evidenziata *L. monocytogenes*. Fonte: ECDC 2020.

Come si può notare dal grafico, tra i vari agenti eziologici presenti nel report EFSA, *L. monocytogenes* è quello con tasso di ospedalizzazione più elevato (97,1%), anche letalità e numero di decessi sono al primo posto. Nello stesso in Europa sono stati identificati 16 focolai a causa del consumo di alimenti contaminati soprattutto riguardanti “pesce e prodotti ittici”, “carne o carne mista o prodotti derivati” e “formaggio”.

## 2. Alimenti ready to eat

### 2.1 Generalità

Per alimenti *ready to eat* si intendono tutti quei prodotti alimentari progettati per essere consumati così come vengono acquistati, senza che il consumatore finale pratichi alcun trattamento. Esistono prodotti *ready to eat* che vengono conservati a temperatura ambiente, (a questa categoria appartengono molti prodotti da forno e alimenti stabili, ad esempio crackers, patatine, pane), surgelati, o refrigerati (vegetali di quarta gamma, carni e formaggi freschi).

I trend di consumo dei cibi RTE sono in aumento, con riferimento particolare ai vegetali di quarta gamma, che nel mese di gennaio 2022 negli USA hanno subito un incremento dell'8% rispetto gennaio dell'anno precedente.

L'aumento di consumo dei RTE è trainato soprattutto dalle ciotole arricchite, chiamate bowls, ovvero un piatto pronto refrigerato che contiene vari ingredienti, sia di origine vegetale, sia di origine animale, che rappresenta nel mercato USA oltre il 16% dei RTE e cresce del 25% (Rivista Fresh Plaza, articolo "Negli stati Uniti la quarta gamma vola").

Nel primo semestre del 2021, negli USA, le insalate pronte per il consumo hanno subito un incremento delle vendite dell'8% rispetto allo stesso periodo del 2020 e del 19% rispetto al 2019. (Rivista Fresh Cut News, il settimanale della quarta gamma).

In Italia, considerando i dati del primo semestre 2019, (prima della Pandemia Covid-19, che ha temporaneamente rallentato i consumi), rispetto al semestre dell'anno precedente, il consumo di alimenti *ready to eat* è aumentato del 9,3%, con un incremento del 25,2% della categoria "piatti pronti" e del 17,9% della verdura di quarta gamma, (Nielsen, 2019).

Secondo Rapporto Italia 2020, il 62% degli Italiani acquista cibi *ready to eat*, di cui il 20,6% lo fa spesso o sempre (Dati Eurospes).

L'Aumento dei livelli di consumo dei cibi *ready to eat* evidenzia le tendenze dei consumatori a dedicare meno tempo alla preparazione dei cibi, prediligendo sempre più il consumo del piatto già pronto, come definito dal Rapporto Coop2019 "La fuga dai fornelli".

## 2.2 Aspetti di sicurezza microbiologica

Gli alimenti *ready to eat*, in particolare quelli refrigerati, rappresentano un rischio maggiore di tipo microbiologico, in particolare per *L. monocytogenes*, rispetto alle altre categorie di *ready to eat*, e in generale a tutti gli alimenti stabilizzati conservati a temperatura ambiente. La necessità di conservare un alimento in refrigerazione, cioè in un ambiente in cui la temperatura è compresa tra 0°C e 4°C, nasce dal fatto che uno o più fattori intrinseci non consentono un efficace controllo microbiologico. I prodotti *ready to eat* che vengono conservati a temperatura ambiente possiedono uno o più fattori intrinseci che impediscono lo sviluppo del patogeno, di conseguenza l'eventuale presenza di qualche cellula è destinata a rimanere tale e non subire nessun incremento durante la conservazione, se non addirittura un calo nella concentrazione. I prodotti RTE che vengono conservati a temperatura ambiente in cui i parametri intrinseci (in particolare pH e AW) sono favorevoli alla crescita, detti alimenti stabilizzati, hanno subito il processo di sterilizzazione commerciale, quindi non costituiscono un rischio. Nei prodotti pronti per il consumo che vengono conservati surgelati, la crescita del batterio è bloccata sia dalla bassa temperatura ( minore o uguale a -18°C), sia dalla diminuzione dell'AW a causa del congelamento, infatti la quota relativamente bassa dell'acqua che non congela comporta la concentrazione dei soluti con conseguente abbassamento dell'AW.

Nei prodotti *ready to eat* refrigerati, l'attività dell'acqua e in molti casi anche il pH, sono favorevoli alla crescita dei microrganismi patogeni, ma in questo caso interviene la bassa temperatura, che è in grado di bloccare la crescita di tutti i batteri strettamente mesofili. Per *L. monocytogenes* questo non è possibile, infatti, essendo un batterio con spiccate tendenze psicrotrofe, la crescita in ambiente refrigerato è possibile. Quindi, in presenza di altri parametri favorevoli, un prodotto *ready to eat* refrigerato consente l'aumento della concentrazione cellulare di *L. monocytogenes*.

Un altro fattore che incide sul rischio del batterio negli alimenti pronti è il fatto che dopo l'acquisto il consumatore non pratica alcun trattamento termico prima del consumo, come una cottura, che sarebbe in grado di far ridurre in maniera significativa il numero di cellule.

Gli alimenti RTE sono considerati dall'EFSA a rischio per *L. monocytogenes*, (Relazione dell'EFSA sui livelli di *Listeria* in alcuni alimenti pronti al consumo, 2013), e la legislazione europea stabilisce regole specifiche che gli operatori dell'industria alimentare devono adottare per ridurre la listeriosi,

che includono la necessità di seguire buone pratiche durante la produzione degli alimenti, prassi igieniche appropriate, e un efficace controllo della temperatura lungo tutta la filiera degli alimenti.

## 2.3 Aspetti legislativi

La legislazione, tramite il regolamento n. 2073/2005 e successive modifiche, stabilisce i criteri microbiologici per alcuni microrganismi, tra cui *L. monocytogenes*, e le norme di attuazione che gli operatori del settore alimentare devono rispettare nell'applicazione delle misure.

Nel piano di campionamento per gli alimenti RTE destinati a categorie a rischio (lattanti o destinazione medica specifica) la presenza di *L. monocytogenes* deve essere assente in 25 grammi, mentre per gli alimenti che non costituiscono terreno favorevole e non destinati a categorie a rischio è ammessa la presenza massima di 100 ufc/g durante il loro periodo di conservabilità.

I prodotti che hanno una shelf life inferiore a cinque giorni, vengono considerati automaticamente come terreno non favorevole. Altrimenti, se la shelf life è maggiore, il terreno non favorevole si indentifica con pH minore o uguale di 4,4 o AW minore o uguale a 0,92; o in alternativa la combinazione di pH inferiore o uguale a 5,0 e AW minore o uguale a 0,94. In tutti gli altri casi il criterio ammesso di non superamento di 100 ufc/g durante la shelf life può essere applicato se il produttore è in grado di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che non verrà superato il limite.

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

Figura 2.1. Criteri di sicurezza alimentare di *L. monocytogenes* per gli alimenti pronti. Fonte: regolamento CE 2073/2005.

## 3. Batteriocine

### 3.1 Caratteristiche generali

Negli anni Cinquanta del Novecento veniva per la prima volta introdotto il termine batteriocina da Francois Jacob per indicare molecole proteiche prodotte da batteri, dotate di attività inibitoria nei confronti di altri batteri diversi dal ceppo produttore ma strettamente correlati ad esso. La prima batteriocina fu descritta da Gratia nel 1925 mentre osservava la capacità di *Escherichia coli* di inibire la crescita di altri batteri simili a livello tassonomico, tre anni dopo, nel 1928, Alexander Fleming aveva caratterizzato il primo antibiotico, ovvero la penicillina.

Si può affermare che a livello storico l'osservazione e la scoperta di antibiotici e batteriocine risale ad un periodo compreso tra gli ultimi anni dell'Ottocento e gli anni Venti del 1900, un intervallo relativamente breve. Ma nonostante questo, le batteriocine furono poco studiate, e gli studiosi si concentrarono prevalentemente sugli antibiotici a causa della loro straordinaria attività antimicrobica che possedevano. Sebbene in passato siano state confuse con i classici antibiotici, le batteriocine mostrano specifiche caratteristiche:

- La loro sintesi avviene nei ribosomi, mentre gli antibiotici vengono sintetizzati da sistemi multi-enzimatici la cui biosintesi non viene bloccata da inibitori della sintesi proteica, al contrario delle batteriocine,
- Il loro spettro d'azione risulta alquanto limitato rispetto agli antibiotici
- La loro capacità antibatterica si manifesta a concentrazioni nanomolari, mentre gli antibiotici sono efficaci a concentrazioni maggiori.

È stato ipotizzato che tutti i batteri e gli archea, quando vengono isolati nei loro habitat naturali, siano dotati della capacità di produrre almeno una batteriocina (Klaenhammer, 1993).

Una parte importante delle batteriocine fino ad ora conosciuta presenta una struttura chimica relativamente complessa, quindi la sua sintesi da parte del batterio comporta un dispendio di risorse cellulari importante, e si presume che la loro produzione sia indispensabile per la sopravvivenza della cellula nell'habitat naturale, ma non in laboratorio, dove i batteri vengono coltivati in condizioni favorevoli al loro sviluppo senza competitor spesso in monocultura con nutrienti in adeguate quantità, condizioni non favorevoli per sintetizzare batteriocine.

## 3.2 Classificazione

Attualmente non esiste una classificazione ufficiale per le batteriocine, nel corso degli anni vari studiosi hanno proposto diverse classificazioni, alcune basate sulla specie o sul genere del ceppo produttore. In altri la classificazione era correlata all'attività della molecola, la modalità di azione, la modalità di escrezione o la struttura amminoacidica.

Di seguito viene riportata la classificazione di Klaenhammer, che nel 1993, ha riorganizzato le batteriocine prodotte dai batteri gram positivi, dividendole in 4 gruppi (Klaenhammer 1993):

- Batteriocine di classe 1 o Lantibiotici. Peptidi a basso peso molecolare, contengono amminoacidi inusuali, possiedono elevata termostabilità, ampio spettro, contengono ponti disolfuro, sono sottoposti a modifiche post-traduzionali.
- Batteriocine di classe 2. Peptidi di maggiori dimensioni e peso molecolare, mediamente contengono 40-60 amminoacidi, mediamente termostabili rispetto alla classe precedente, importanti in quanto molte sono efficaci contro *L. monocytogenes*, attive sulla membrana cellulare, suddivise ulteriormente in tre sottogruppi (2A,2B,2C);
- Batteriocine di classe 3. Proteine con dimensioni e pesi molecolari ancora più elevati (>30 kDa), termosensibili, spettro ristretto, di scarso valore poiché possono inibire i batteri lattici utili a scopo tecnologico;
- Batteriocine di classe 4. Complesse strutture proteiche associate a componenti di natura lipidica e/o glucidica, termosensibili, possiedono attività contro *L. monocytogenes*. In genere possiedono scarso interesse a livello tecnologico poiché sensibili ai trattamenti termici e più soggette alla perdita dell'attività inibitoria anti-*Listeria*

### 3.2.1 Lantibiotici

I lantibiotici sono le batteriocine appartenenti alla prima classe, chiamati così per la presenza di caratteristici amminoacidi di tipo policiclico, la lantionina e la beta-metillantionina, che in seguito a modifiche post-traduzionali vengono inseriti nella molecola; sono presenti anche residui deidratati, come l'amminoacido insaturo deidroalanina (DHA) e deidrobutilirina (DHB). Questi amminoacidi hanno la funzione di determinare la formazione della struttura ciclica, che sembra coinvolta nella spiccata capacità dei lantibiotici di resistere alle proteasi (Chen and Hoover 2003).

Una ulteriore suddivisione di questa classe è basata sulla struttura della molecola:

- Lantibiotici di tipo A: Possiedono una forma elicoidale e flessibile, sono molecole anfipatiche che agiscono tramite depolarizzazione della membrana delle cellule bersaglio, favorendo la formazione di pori sulla stessa, con fuoriuscita di materiale citoplasmatico, sbilanciamento del gradiente protonico, flusso incontrollato di soluti e conseguente morte cellulare. A questa classe appartengono nisina A, nisina Z, pediocina, subtilina ed epidemina.
- Lantibiotici di tipo B: Comprende peptidi di dimensioni di 2 kDa e conformazione globulare. Agiscono tramite interferenze con le reazioni enzimatiche essenziali per la crescita cellulare, come il blocco della sintesi della parete cellulare. Possono avere carica negativa o neutra, a questa classe appartengono lactocina B, mersacidina, actagardina e mutacina 2.

I lantibiotici risultano particolarmente efficaci contro i batteri gram positivi, tra cui *Listeria monocytogenes*, mentre non risultano attivi contro i gram negativi, probabilmente a causa della presenza della membrana esterna che impedisce l'assorbimento delle molecole e il conseguente raggiungimento della membrana citoplasmatica.

### 3.2.1.1 Focus sulla nisina

La nisina è la batteriocina più utilizzata e conosciuta, viene prodotta dal batterio *Lactococcus lactis*. È stata isolata per la prima volta nel 1947 e autorizzata come additivo alimentare già negli anni Cinquanta del secolo scorso nel Regno Unito, e attualmente ne è autorizzato l'impiego come additivo (E234) in oltre 50 paesi.

Il suo utilizzo come additivo nell'Unione Europea è disciplinato dal regolamento UE 321/2012, con successivi aggiornamenti, che la definisce una miscela di parecchi polipeptidi strettamente correlati prodotti dal ceppo *Lactococcus lactis sub. Lactis*. Per poterla commercializzare come additivo, il concentrato deve contenere non meno di 900 unità per milligrammo, ovvero il 90% in peso, di una miscela di proteine o solidi fermentati del latte scremato contenente almeno il 50% di cloruro di sodio. Il prodotto in genere viene commercializzato sotto forma di una polvere bianca che viene aggiunta agli alimenti, anche risospesa in acqua.

Il regolamento UE 1333/2008 e relativi aggiornamenti (UE 1129/2011) ne fissano i limiti per le categorie di alimenti in cui ne è autorizzato l'impiego, ad esempio fissando il limite di 12,5 mg/kg per i formaggi e 25 mg/kg per i prodotti a base di carne trattata termicamente.

La sua dose letale è stata quantificata in 6950 mg/kg di peso corporeo, quando assunta per via orale. Uno studio, (Akihiro et al, 2010), ha valutato gli effetti della nisina somministrata a livello dietetico in ratti in un periodo di 90 giorni condotto in conformità delle buone pratiche di laboratorio (BPL), l'assunzione media giornaliera era compresa tra 0 e 2996 mg/kg di peso corporeo, e non sono stati osservati decessi durante tutto il periodo di studio o alcun segno clinico di anomalia. Per quanto riguarda la genotossicità non sono stati riscontrati effetti in base agli studi condotti nel 2006 dal gruppo di esperti AFC, i quali hanno concordato che non vi sono preoccupazioni riguardo il potenziale genotossico della nisina.

Da un punto visto chimico, la molecola è costituita da un peptide di 34 amminoacidi, in posizione terminale sono presenti isoleucina con gruppo amminico e lisina con gruppo carbossilico, il suo peso molecolare è di 3,5 kDa. Dopo la traduzione, che avviene a livello ribosomiale, la molecola neofornata è in forma inattiva, e contiene un numero maggiore di amminoacidi, ovvero 57, con 23 residui nella regione leader e 34 residui nella regione strutturale. In seguito a modifiche enzimatiche, viene rimossa la zona leader, e la batteriocina diventa attiva, come illustrato nella figura sottostante.

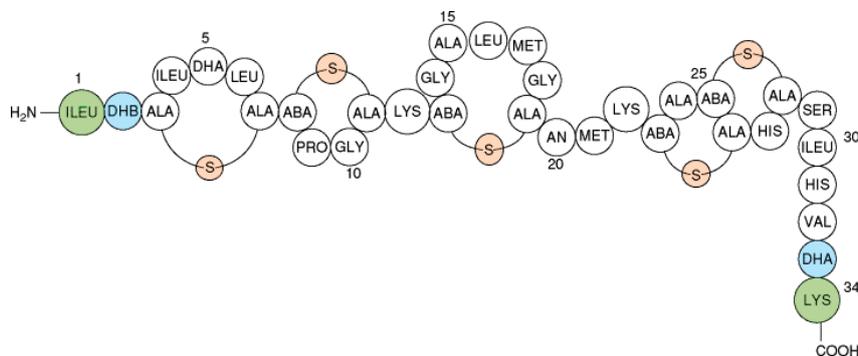


Figura 3.2. Struttura della nisina A. In verde i due amminoacidi terminali (isoleucina N-terminale, lisina C-terminale) con i rispettivi gruppi amminico e carbossilico liberi, in azzurro i due amminoacidi reattivi (DHB DHA) e in rosso i ponti disolfuro. Struttura del peptide attivato, dopo la rimozione della regione leader. ( Enciclopedia delle scienze alimentari e della nutrizione seconda edizione 2003).

La batteriocina possiede una modalità di azione doppia, può legarsi ai lipidi presenti nella membrana cellulare, ostacolando i trasportatori del peptidoglicano, con conseguente difficoltà da parte della cellula nel sintetizzare nuova parete, oppure può inserirsi nel doppio strato fosfolipidico della membrana formando dei canali sulla stessa con alterazione dell'equilibrio osmotico e del gradiente protonico tra il lato citoplasmatico ed extracellulare, con conseguente inibizione delle funzionalità cellulari e morte.

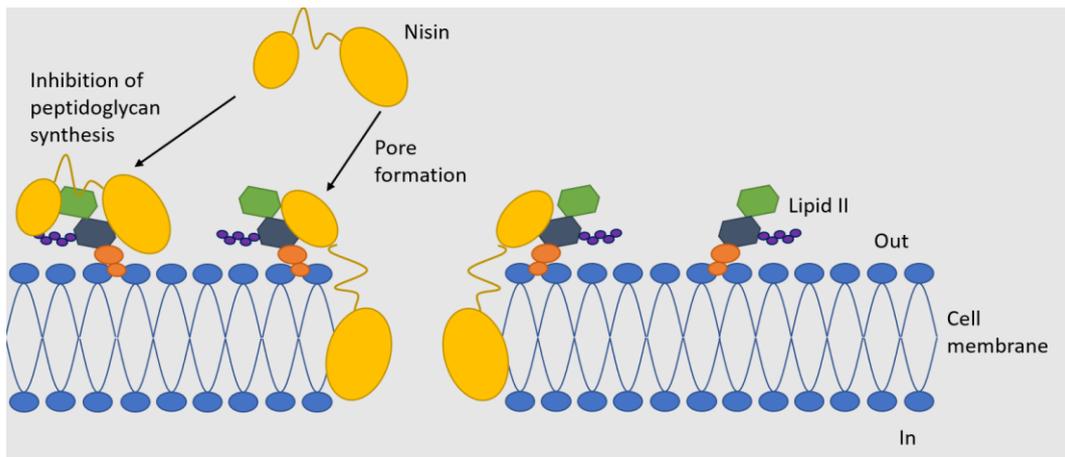


Figura 3.3. Rappresentazione delle due modalità di azione della nisina. ( iGEM.org 2018).

### 3.2.2 Batteriocine di classe II

Alle batteriocine di classe due sono compresi i peptidi con un peso molecolare inferiore a 10 kDa, cationici, idrofobici e relativamente stabili ai trattamenti termici. Dopo la traduzione non subiscono modificazioni ad eccezione della formazione di ponti disolfuro e il distacco del peptide leader sul quale è presente il sito di maturazione che è formato da due amminoacidi di glicina.

Le batteriocine di classe II vengono ulteriormente suddivise in tre sottoclassi, ovvero IIA, IIB e IIC.

- Le batteriocine di classe IIA vengono anche chiamate pediocina simili o batteriocine anti-*Listeria*, infatti possiedono ottima attività inibitoria verso questo patogeno. In questo gruppo vengono raggruppate le batteriocine che contengono una sequenza idrofila e due residui di cisteina uniti tra loro tramite un ponte disolfuro, che serve per stabilizzare la struttura beta-sheet, e ne conferisce stabilità, mentre la regione C-terminale contiene il dominio del sito attivo, che svolge la funzione antimicrobica delle cellule bersaglio. Queste batteriocine vengono sintetizzate nella forma inattiva, infatti, solamente il taglio proteolitico nella regione N-terminale la rende attiva. Infatti, quando la batteriocina viene sintetizzata e si trova nel citosol, non è dotata di alcuna attività, infatti, la regione interessata dal taglio proteolitico, funge anche da riconoscimento per un trasportatore cellulare che ne permette la secrezione. Il meccanismo di azione comprende alterazioni della membrana plasmatica, con la fuoriuscita di ioni e piccole molecole, nonché l'alterazione del potenziale di membrana.
- Le batteriocine di classe IIB comprendo tutte le molecole definite non pediocina-simili, e sono costituite da due peptidi con un numero di amminoacidi che varia tra 25 a 40 per ogni

peptide. Per poter svolgere l'attività antimicrobica, la batteriocina deve possedere entrambi i peptidi. Anche per questo sottogruppo è necessario il taglio proteolitico della sequenza leader in posizione N-terminale, infatti il peptide viene sintetizzato in forma inattivata. Il taglio avviene durante il trasporto fuori dalla cellula. Il loro meccanismo di azione si basa sulla formazione di pori sulla membrana plasmatica e alterazione del potenziale. Le più comuni batteriocine di questa classe sono le enterocine.

- Le batteriocine di classe IIC sono composte da peptidi tiolo-attivi, risultano più sensibili ai trattamenti termici rispetto ai due sottogruppi precedenti, necessitano di alcune riduzioni dei residui di cisteina per esplicare la loro azione antimicrobica. Spesso assumono struttura ciclica per interazione tra i gruppi terminali carbossilico e aminico.

### 3.2.3 Batteriocine di classe III

Le batteriocine di classe III, chiamate anche batteriolisine, comprendono varie molecole proteiche con un peso molecolare maggiore di 30 kDa, rispetto alle classi precedenti risultano maggiormente termosensibili, e possiedono una struttura ciclica. Un'altra differenza risiede nel meccanismo di azione, infatti, una volta che vengono in contatto con il batterio bersaglio, ne provocano la lisi della parete cellulare, e in questo processo sono coinvolte entrambe le estremità della proteina, ovvero la parte C-terminale, che è coinvolta nel riconoscimento della cellula batterica, mentre la parte N-terminale favorisce l'idrolisi dei legami tra i peptidi presenti sulla parete, infatti risulta analoga alle endopeptidasi.

### 3.2.4 Batteriocine di classe IV

Le batteriocine che sono comprese nella classe IV comprendono molecole proteiche di dimensioni relativamente maggiori rispetto alle altre classi, e spesso sono legate a subunità di natura non proteica, ad esempio glucidi e lipidi, che risultano fondamentali per espletare l'attività inibitoria.

Da un punto di vista tecnologico, la loro importanza risulta alquanto limitata, infatti, data la complessità delle loro strutture chimiche, rispetto alle batteriocine delle altre classi, risultano termosensibili e meno stabili a variazioni di pH. Negli alimenti, data la loro complessità nella composizione a livello chimico, e nelle lavorazioni tecnologiche, è preferibile utilizzare molecole stabili al calore e al pH, per garantire un'ampia variabilità di substrati in cui non ne viene compromessa l'efficacia.

## 4. Applicazione delle batteriocine negli alimenti RTE

### 4.1 Inibizione della crescita di *L. monocytogenes*

Nel capitolo 2 relativo agli aspetti legislativi degli alimenti RTE è stato riportato il regolamento 2073/2005 in cui si indentificano tre categorie di prodotti, in particolare, il controllo della crescita del patogeno tramite l'applicazione di batteriocine è giustificato in alcune condizioni, infatti:

- Nel punto 1.1 (Alimenti pronti per lattanti e a fini medici speciali) *L. monocytogenes* deve risultare assente in 25 grammi, ciò presuppone che l'eventuale presenza di almeno una cellula renda il prodotto non conforme, generalmente non ne è giustificato l'impiego data la particolare attenzione alla selezione delle materie prime e il controllo sui processi produttivi,
- Nel punto 1.3 (Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole diversi da quelli del punto 1.1.) qualora sia presente *L. monocytogenes*, le condizioni intrinseche dell'alimento ne impediscono già lo sviluppo, quindi l'impiego di batteriocine per controllare la crescita non è giustificato,
- Il punto 1.2 (Alimenti che costituiscono terreno favorevole) risulta di particolare importanza, infatti, le cellule del patogeno, qualora presenti, sono in grado di crescere e replicarsi, con conseguente aumento durante la shelf life della concentrazione cellulare, questo giustifica l'eventuale impiego di batteriocine per inibire la crescita.

L'obiettivo di questo elaborato, quindi, si concentra su tutti i prodotti ready to eat in cui la presenza di cellule di *L. monocytogenes* si riscontra e in cui il substrato di crescita sia favorevole, e il produttore adotta il limite di 100 ufc/g durante la shelf life. Questo è dovuto al fatto che la prevalenza relativamente elevata del batterio in alcuni alimenti non possa garantire ai produttori di adottare il limite di assenza in 25 grammi.

Va posta particolare attenzione per tutti gli alimenti RTE refrigerati che hanno shelf life relativamente lunghe, infatti per alcuni prodotti a base di carne o formaggi tagliati, porzionati e conservati refrigerati in confezioni singole, può arrivare a 60 giorni, in questi casi le contaminazioni secondarie sono prevalenti, e i tempi relativamente lunghi di conservazione possono far aumentare la concentrazione del patogeno a livelli ragguardevoli.

Quindi, in un prodotto che possiede le caratteristiche sopra indicate, l'obiettivo è di non incrementare la concentrazione delle cellule del patogeno durante la shelf life, applicando una o più

batteriocine, con varie tecniche, durante il processo produttivo, in modo che il prodotto, una volta confezionato e conservato in refrigerazione, diventi terreno non favorevole alla crescita grazie alle proprietà anti-*Listeria* di queste sostanze.

## 4.2 Metodi di applicazione delle batteriocine

### 4.2.1 Colture protettive

La tecnica di utilizzo delle colture protettive consiste nell'inoculare i ceppi di batteri lattici direttamente nell'alimento, e di far produrre in situ le batteriocine. Il ruolo dei batteri lattici nella protezione biologica degli alimenti è noto da secoli, soprattutto nei prodotti fermentati come latticini, vegetali fermentati, salumi e impasti acidi, in cui, oltre alle batteriocine, vengono prodotte numerose altre molecole dotate di attività antimicrobica e in grado di prolungare la shelf life dei prodotti.

L'applicazione di questa tecnica nei prodotti RTE refrigerati presenta alcune criticità che non la rendono in molti casi idonea ed efficace. Un primo aspetto da considerare risulta la temperatura, infatti, nei prodotti in cui si utilizza questa tecnica, la produzione dei metaboliti batterici avviene a temperature relativamente elevate, (durante la fermentazione del latte per la produzione dello yogurt 35°C – 44°C o per le carni fermentate 15°C – 20°C), che consentono una crescita ottimale dei LAB e una conseguente competizione con gli altri microrganismi, inoltre è presente l'aspetto tecnologico, infatti vengono anche prodotte molecole che contribuiscono alle caratteristiche fisiche e organolettiche degli alimenti.

In tutti gli alimenti RTE refrigerati che non prevedono l'impiego di LAB a scopo tecnologico, (vegetali di quarta di gamma, carni pronte per il consumo, cotte o crude, formaggi tagliati e porzionati conservati in buste), l'eventuale impiego di LAB sarebbe possibile inoculando il prodotto prima della conservazione in refrigerazione, con lo scopo di far produrre le batteriocine durante la shelf per bloccare la crescita di *L. monocytogenes*.

Una importante criticità risulta proprio la temperatura, infatti, la conservazione tra 0°C e 4°C ha lo scopo di rallentare la crescita di tutti i microrganismi presenti nell'alimento, patogeni e deterioranti, rallentando le loro attività metaboliche, compresi eventuali LAB naturalmente presenti o aggiunti.

Considerando uno studio pubblicato sulla rivista Food Microbiology (Allende et al., 2007), che valuta la crescita e la produzione di batteriocine di alcuni ceppi di LAB in un estratto di lattuga di quarta gamma, si può affermare che la maggior parte dei batteri lattici non è in grado di offrire una adeguata protezione contro *L. monocytogenes*.

Lo studio ha valutato il tasso di crescita di cinque ceppi batterici produttori di batteriocine, a tre diverse temperature.

La temperatura di 4°C risulta quella ottimale di conservazione dei prodotti RTE refrigerati, 10°C rappresenta un caso di abuso termico, in quanto si presuppone che nei frigoriferi domestici non sempre venga garantita la temperatura di conservazione corretta, e 32°C che corrisponde ad un valore di temperatura compreso nel range in cui i ceppi utilizzati possiedono il tasso di crescita maggiore.

Nel grafico sottostante si nota che a 4°C i tassi di crescita risultano relativamente bassi, mentre a 32°C raggiungono valori più elevati, ciò evidenzia che in refrigerazione le attività metaboliche dei ceppi sono fortemente rallentate.

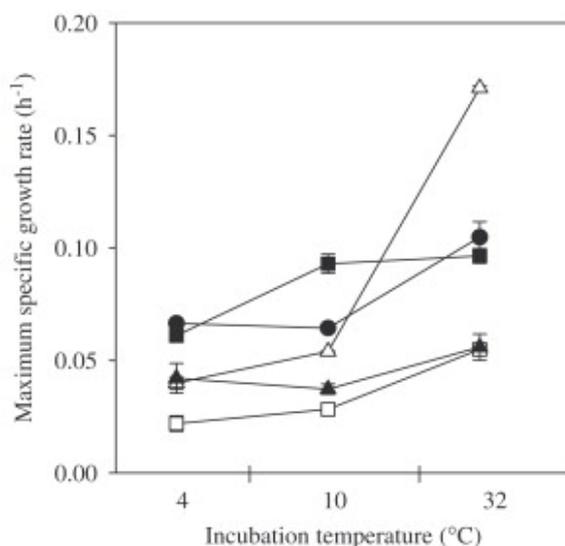


Fig. 4.1. . Tassi di crescita specifici di *Pediococcus acidilactici* 347 (pediocina PA-1) (■), *Lactobacillus plantarum* LL441 (plantaricina C) (▲), *Lactobacillus paraplantarum* IPLA C23 (coagulina) (●), *Lactococcus lactis* IPLA C270 (latticina 481) (□) e *Lactococcus lactis* IPLA 1064 (nisina Z) (▲) a 4, 10 e 32 °C nell'estratto di lattuga. (n = 3). (Allende A. et al., 2007).

Misurando l'attività batteriocinogena dei surnatanti batterici privi di cellule, si nota dalla tabella sottostante, che alle temperature di 4°C e 10°C, tutti i ceppi, ad esclusione di *Lactococcus lactis* IPLA 1064, non sono in grado di contrastare la crescita di *L. monocytogenes*. L'attività inibitoria è stata misurata tramite il test di diffusione in piastra aggiungendo circa  $10^5$  cellule di *L. monocytogenes* e 20 microlitri di diluzioni seriali doppie di surnatante batterico. Le piastre sono state esaminate per la presenza di zone di inibizione e il titolo è stato definito come il reciproco della diluizione seriale più alta che mostrava una inibizione della crescita del patogeno, ed espresso come unità arbitrarie per ml (AU/ml).

Questo dimostra come la maggior parte dei batteri lattici non sono in grado di svilupparsi e contrastare la crescita del patogeno in un prodotto ready to eat conservato in regime di refrigerazione, inoltre, anche se non affrontato in questo elaborato, vanno sempre considerate le possibili alterazioni del prodotto che i LAB possono provocare sul prodotto.

| Bacteriocin-producing strains               | Incubation temperature |       |         |       |         |       |
|---|------------------------|-------|---------|-------|---------|-------|
|   | 32 °C                  |       | 10 °C   |       | 4 °C    |       |
|   | pH                     | AU/ml | pH      | AU/ml | pH      | AU/ml |
| <i>Lactobacillus paraplantarum</i> IPLA C23 | 3.5±0.1                | 200   | 5.6±0.1 | 0     | 5.7±0.1 | 0     |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> LL441        | 3.6±0.3                | 0     | 5.5±0.1 | 0     | 5.7±0.1 | 0     |
| <i>Lactococcus lactis</i> IPLA 1064         | 3.9±0.1                | 100   | 6.2±0.2 | 50    | 6.1±0.1 | 50    |
| <i>Lactococcus lactis</i> IPLA C270         | 3.8±0.1                | 50    | 5.1±0.1 | 0     | 6.0±0.1 | 0     |
| <i>P. acidilactici</i> 347                  | 3.4±0.3                | 100   | 5.7±0.2 | 0     | 5.6±0.2 | 0     |

Figura 4.1. Attività inibitoria, espressa come AU/ml, misurata rispetto ai ceppi indicatori. (Allende et al., 2007).

#### 4.2.2 Applicazione di surnatanti batterici privi di cellule

Per evitare le criticità osservate nella tecnica precedentemente descritta, esiste un altro metodo di applicazione di batteriocine, ovvero l'utilizzo dei surnatanti batterici privati delle cellule. La tecnica consiste nel coltivare i ceppi di LAB interessati su terreni di coltura specifici e alle temperature ottimali di crescita, in genere in fermentatori che consentono una produzione relativamente elevata di surnatante in base alle esigenze, quindi si ottiene il brodo colturale che viene parzialmente purificato, con l'eliminazione delle cellule tramite una centrifugazione.

La soluzione viene opportunamente diluita per ottenere una concentrazione di batteriocine sufficiente ad inibire la crescita del patogeno, una volta applicata nell'alimento.

Prendendo in considerazione lo studio precedentemente citato, la coltivazione dei ceppi alla temperatura di 32°C, garantisce una attività inibitoria nettamente superiore rispetto alla coltivazione alla temperatura di refrigerazione, quindi, per valutare l'azione anti-*Listeria* dei surnatanti sono state inoculate con gli stessi delle piastre con una concentrazione di circa 10<sup>4</sup> ufc/cm<sup>2</sup> di una miscela di cinque ceppi di *L. monocytogenes*. I surnatanti sono stati inoculati nelle piastre per avere una concentrazione finale di 50 AU/ml e incubati a 4°C per ore.

Dalla tabella sottostante si nota che, diversamente dalla prova precedente, in refrigerazione tutti i surnatanti possiedono attività inibitoria, anche se alcuni non sono efficaci per uno o più ceppi di patogeno. Inoltre, è stata testata l'azione di un mix di due batteriocine, nisina e coagulina.

| Bacteriocin-producing strains <sup>a</sup> | pH      | Inhibitory activity <sup>b</sup> (AU/ml) against <i>Listeria</i> strains |          |           |           |
|--|---------|--|----------|-----------|-----------|
|  |         | CECT 910   | CECT 940 | CECT 4032 | CECT 5672 |
| <i>Lactobacillus paraplantarum</i> C23     | 4.5±0.2 | 1600   | IND      | 400       | 100       |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> LL441       | 4.1±0.1 | 50   | 50       | 50        | 100       |
| <i>Lactococcus lactis</i> IPLA 1064        | 4.9±0.2 | 200  | 200      | 800       | 200       |
| <i>Lactococcus lactis</i> C270             | 4.3±0.2 | 50   | IND      | 50        | IND       |
| <i>P. acidilactici</i> 347                 | 5.2±0.1 | 400  | IND      | 200       | 200       |
| Cocktail (Nisin-Coagulins) <sup>c</sup>    | 4.8±0.2 | 800  | 50       | 800       | 100       |

Figura 4.2. Attività inibitoria dei vari surnatanti prodotti da ciascun ceppo di LAB su piastre integrate con vari ceppi di *L. monocytogenes*. n=3. (Allende et al., 2007).

Fino ad ora è stata analizzata l'attività dei surnatanti per il controllo del patogeno nei vegetali di quarta gamma, utilizzando piastre con l'estratto di lattuga. Prendendo in considerazione un'altra categorie di alimenti RTE che vengono conservati in refrigerazione, ovvero i prodotti a base di carne, e utilizzando non più piastre ma l'alimento vero e proprio, possiamo valutare le proprietà di controllo di *L. monocytogenes* di una batteriocina chiamata Pediocina 05-10, che viene sintetizzata dal batterio *Pediococcus pentosaceus* 05-10.

Lo studio in esame, (Ying et al., 2008), applica la batteriocina sul prosciutto di maiale conservato in refrigerazione, tagliato in pezzi di 4 cm<sup>2</sup> per 1 centimetro di spessore, e questo simula a tutti gli effetti tutti quei prodotti RTE a base di carne che vengono tagliati, porzionati e confezionati refrigerati in confezioni di plastica, in cui la shelf life può raggiungere anche i 40-60 giorni. In questi casi, le contaminazioni da *L. monocytogenes* sono prevalentemente di tipo secondario, ovvero si verificano durante il taglio e il confezionamento nello stabilimento, quindi interessano la superficie del prodotto.

I pezzi di prosciutto sono stati divisi in due lotti, il primo è stato immerso nel surnatante batterico privato delle cellule tramite che contiene una quantità di batteriocina pari a 320 AU/ml, per un tempo di 15 minuti ad una temperatura di 4°C, il secondo è stato trattato con i surnatanti inattivati.

È interessante notare la notevole termoresistenza di questa batteriocina, sono necessari infatti 20 minuti a 121°C per farle perdere le sue proprietà anti-*Listeria*, infatti dopo 15 minuti di trattamento possiede ancora parzialmente attività inibitoria. Questa caratteristica è importante qualora la sua applicazione, per varie ragioni, avvenga prima di un eventuale trattamento termico, in quanto non pregiudica le sue proprietà antimicrobiche.

Successivamente, i due lotti sono stati immersi in una soluzione contenente il ceppo *L. monocytogenes* 54002 (circa 10<sup>7</sup>UFC/ml) per 30 minuti a 37°C e conservati per 10 giorni a 4°C.

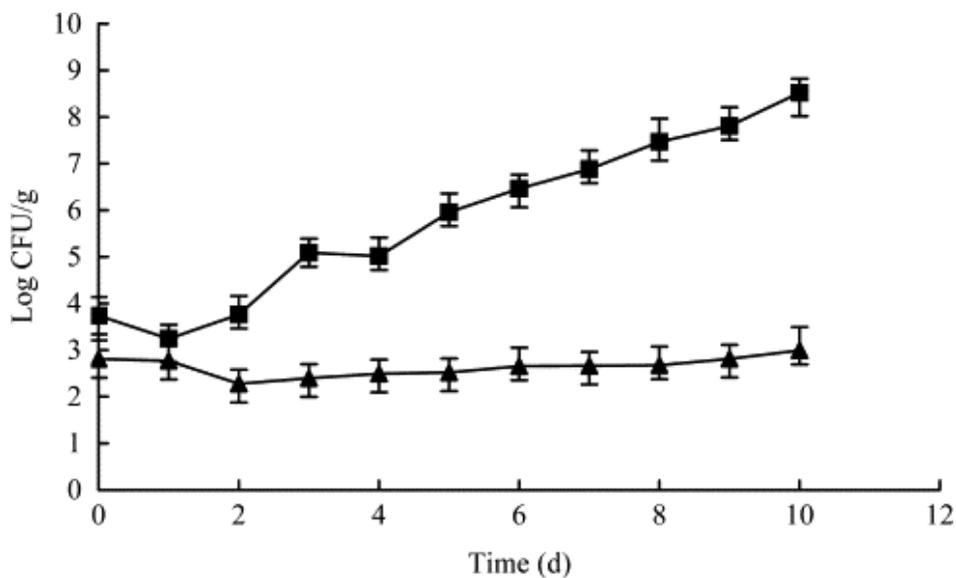


Figura 4.3. Biocontrollo di *L. monocytogenes* nel prosciutto di maiale mediante Pediocina 05-10 a 4 °C. La determinazione delle CFU di *L. monocytogenes* è stata effettuata ogni giorno. Il lotto I è stato pretrattato con la batteriocina e quindi incubato con *L. monocytogenes* (▲); il lotto II è stato pretrattato con la batteriocina inattivata e quindi incubato con *L. monocytogenes* (■). n=2. ( Ying et al., 2008).

Al tempo zero si nota come nel campione contenente la batteriocina attiva, la concentrazione del patogeno risulta minore, infatti, secondo gli autori, è dovuto alla capacità della batteriocina di impedire in parte l'adesione del patogeno alla superficie del prosciutto. La conta cellulare è stata eseguita una volta al giorno, per un periodo di 10 giorni, e si nota come l'applicazione della batteriocina non solo inibisce la crescita del patogeno, ma ne provoca una progressiva diminuzione nella concentrazione. Allo stesso tempo, nel campione contenente la batteriocina inattivata, la concentrazione del ceppo, è aumentata di circa 4 ordini di grandezza durante la shelf life. Questo

dimostra come le fette di prosciutto conservate in refrigerazione costituiscano un terreno nettamente favorevole allo sviluppo di *L. monocytogenes*.

Prendendo in considerazione carni RTE in cui la shelf life può raggiungere o superare i 60 giorni, una soluzione molto efficace è rappresentata nell'utilizzo di un mix di surnatanti batterici contenenti diverse batteriocine, in cui si possono citare due aspetti che suggeriscono una migliore azione di questa tecnica. Il primo riguarda il fenomeno delle resistenze, infatti, utilizzando diverse batteriocine con diversi meccanismi d'azione può sicuramente diminuirne il rischio, il secondo aspetto riguarda l'efficacia di ogni singola batteriocine per ogni ceppo di patogeno, infatti, nello studio che valuta l'azione delle singole batteriocine sui cinque ceppi di *L. monocytogenes* nell'insalata di quarta gamma, (Allende et al., 2007), alcuni surnatanti non possiedono attività inibitoria verso uno dei ceppi. Quindi, impiegando un mix di batteriocine aumenta la probabilità che ogni ceppo di *L. monocytogenes* eventualmente presente risulti sensibile ad almeno una di esse.

Lo studio pubblicato sulla rivista Foods, (Paul et al., 2017), valuta la capacità di due mix di surnatanti batterici contenenti ciascuno quattro batteriocine, di inibire la crescita di *L. monocytogenes* su hot dog di carne di manzo e maiale conservati in refrigerazione. Dopo una pastorizzazione, che prevedeva il riscaldamento del prodotto fino a raggiungere gli 88°C nel suo punto più interno, è stato inoculato in superficie con una soluzione di *L. monocytogenes* 39-2 e una miscela di parti uguali dei vari surnatanti, successivamente è stato conservato a 5°C per un periodo di 90 giorni.

Nella prova sono stati utilizzati *Lactobacillus curvatus* FS47, *Pediococcus acidilactis*, *Enterococcus faecium* FS56-1, *E. thailandicus* FS92 e *L. lactis* FLS1.

I campionamenti per la conta della popolazione di patogeno sono stati eseguiti al tempo zero, dopo tre gironi, e settimanalmente.

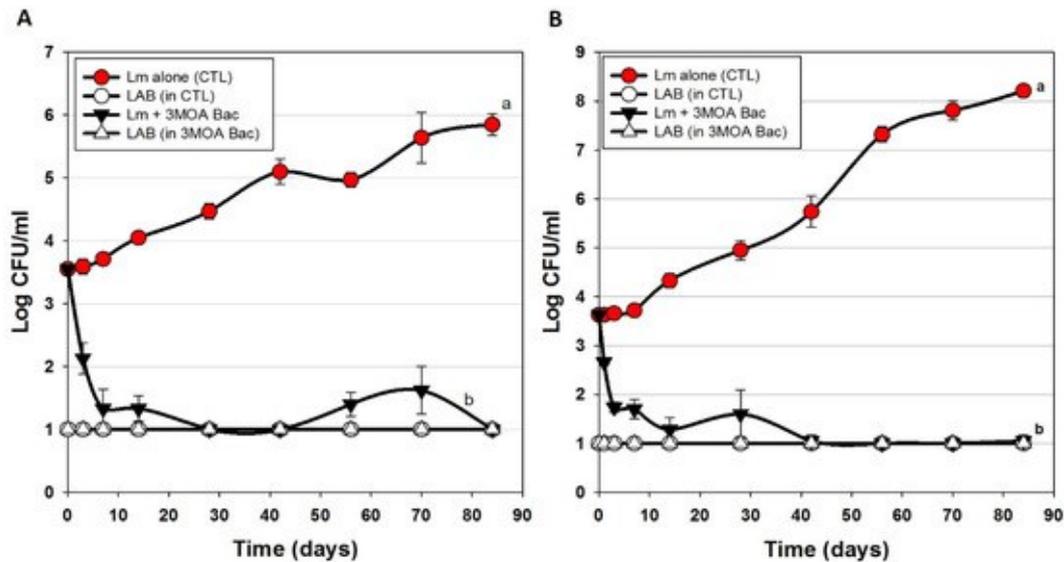


Figura 4.4. *L. monocytogenes* 39-2 è stato inoculato su hot dog da solo (come controllo) o con estratti di batteriocina aggiunti. ( A ) Gli estratti di batteriocina includevano curvaticina FS47, pediocina Bac3, enterocina FS56-1 ed enterocina FS92. ( B ) Gli estratti di batteriocina includevano curvaticina FS47, pediocina Bac3, enterocina FS56-1 e latticina FLS1. Tutte le prove sono state eseguite in replicazione triplicata. (Paul et al., 2017).

Dai grafici si nota che l'applicazione dei due mix di surnatanti garantisce un'ottima inibizione di *L. monocytogenes* fino ad un periodo di 90 giorni, nonostante in entrambe le prove, in tempi diversi, si verifichi un aumento di circa mezzo logaritmo delle cellule di patogeno, che comunque tende a ristabilirsi mantenendo la concentrazione ben al di sotto del testimone. Anche questo alimento, come si nota dal grafico rosso, rappresenta un substrato favorevole alla crescita del patogeno, infatti, nel periodo di shelf life, la sua concentrazione aumenta di circa 2,5 logaritmi, in assenza dei surnatanti.

### 4.2.3 Applicazione di batteriocine purificate

Nella tecnica precedente si è analizzato l'impiego di surnatanti contenenti batteriocine private delle cellule. Un altro metodo di applicazione di questi metaboliti batterici consiste nella loro parziale o totale purificazione, quindi si ottiene un concentrato caratterizzato da una elevata concentrazione di batteriocine, rispetto al surnatante di partenza. Questa tecnica presenta un limite, infatti, la purificazione della batteriocina la fa diventare a tutti gli effetti un additivo, e quindi il suo utilizzo viene regolamentato.

Tra tutte le batteriocine analizzate, che possiedono delle evidenti e spiccate capacità di controllo di *L. monocytogenes*, solo la Nisina, attualmente, è autorizzata come conservante negli alimenti.

Lo studio pubblicato sulla rivista Food Microbiology (Lihui et al., 2017) confronta l'efficacia di un additivo a base di Nisina con due batteriocine purificate prodotte dal batterio *Enterococcus durans* 152 nel controllare la crescita di *L. monocytogenes* nel prosciutto refrigerato. I ceppi del patogeno comprendono LM101 (sierotipo 4b, isolato di salame), LM112 (sierotipo 4b, isolato di salame), LM113 (sierotipo 4b, isolato di peperoni), H9666 (sierotipo 1/2c, isolato umano) e ATCC 5779 (sierotipo 1/2c, isolato di formaggio).

Le due batteriocine prodotte dal ceppo, denominate DH e DL, a differenza degli studi precedenti in cui sono stati utilizzati i surnatanti privati delle cellule, sono state inizialmente centrifugate per l'eliminazione delle cellule, e successivamente liofilizzate e separate tramite elettroforesi con l'ottenimento di una polvere da risospendere in acqua.

I campioni di prosciutto sono stati inoculati in superficie con la soluzione contenete una miscela in parti uguali dei ceppi di patogeno e per ogni prova è stata inoculata una soluzione di 0,5 ml contenete la batteriocina. Per dimostrare l'elevata efficacia delle due molecole ( DH e DL) la Nisina è stata inoculata alla concentrazione di 500 ppm, ovvero il doppio rispetto al limite consentito dalla FDA negli stati uniti per alcuni alimenti, ovvero 1600 AU/m, DH A 400 AU/ml e DL a 200 AU/ml.

I campioni di prosciutto sono stati conservati a 8°C, temperatura da considerarsi di abuso termico, per simulare la conservazione del prodotto in un frigorifero domestico.

La conta della popolazione del patogeno è stata eseguita al tempo zero e successivamente ogni settimana, per un periodo totale di 10 settimane.

| Time <sup>Ⓢ</sup> | <i>Listeria</i> counts (log <sub>10</sub> CFU/g) for different treatments |                           |                           |                           |
|-------------------|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                   | Peptone   | Nisin                     | D-H                       | D-L                       |
| W0                | 3.56 ± 0.06 <sup>Aa</sup>   | 3.31 ± 0.16 <sup>Aa</sup> | 3.57 ± 0.33 <sup>Aa</sup> | 3.43 ± 0.11 <sup>Aa</sup> |
| W1                | 3.46 ± 0.31 <sup>Aa</sup>   | 3.19 ± 0.01 <sup>Aa</sup> | 3.55 ± 0.41 <sup>Aa</sup> | 3.44 ± 0.44 <sup>Aa</sup> |
| W2                | 3.34 ± 0.16 <sup>Aa</sup>   | 2.96 ± 0.35 <sup>Aa</sup> | 3.23 ± 0.45 <sup>Aa</sup> | 3.12 ± 0.34 <sup>Aa</sup> |
| W3                | 4.66 ± 0.46 <sup>Aa</sup>   | 3.78 ± 0.33 <sup>Ab</sup> | 3.27 ± 0.04 <sup>Ab</sup> | 3.31 ± 0.29 <sup>Ab</sup> |
| W4                | 5.35 ± 0.66 <sup>Aa</sup>   | 2.92 ± 0.19 <sup>Ab</sup> | 3.73 ± 0.96 <sup>Ab</sup> | 3.21 ± 0.21 <sup>Ab</sup> |
| W5                | 7.21 ± 1.88 <sup>ABa</sup>  | 3.20 ± 0.35 <sup>Ab</sup> | 4.08 ± 1.24 <sup>Ab</sup> | 3.65 ± 0.94 <sup>Ab</sup> |
| W6                | 8.49 ± 0.81 <sup>Ba</sup>   | 3.06 ± 0.25 <sup>Ab</sup> | 3.35 ± 0.08 <sup>Ab</sup> | 3.03 ± 0.34 <sup>Ab</sup> |
| W7                | 9.50 ± 0.62 <sup>Ba</sup>   | 4.72 ± 0.86 <sup>Ab</sup> | 3.95 ± 1.01 <sup>Ab</sup> | 3.39 ± 0.38 <sup>Ab</sup> |
| W9                | 8.51 ± 0.04 <sup>Bb</sup>   | 9.23 ± 0.08 <sup>Ba</sup> | 3.20 ± 0.21 <sup>Ac</sup> | 3.00 ± 0.35 <sup>Ac</sup> |
| W10               | 9.80 ± 0.37 <sup>Ba</sup>   | 9.34 ± 0.28 <sup>Ba</sup> | 3.02 ± 0.61 <sup>Ab</sup> | 3.10 ± 0.13 <sup>Ab</sup> |

Figura 4.5. Concentrazione di *L. monocytogenes* nei vari campioni di prosciutto contenenti le batteriocine DH,DL e nisina conservati alla temperatura di 8°C. (Lihui et al., 2017).

Dalla tabella si nota che nel testimone, cioè il campione di prosciutto in cui è stato inoculato un peptone contenente la miscela dei ceppi patogeni, la concentrazione di *L. monocytogenes* subisce un progressivo aumento nella concentrazione, soprattutto a partire dalla terza settimana, raggiungendo alla decima settimana un ordine di grandezza di oltre 6 volte rispetto al tempo zero, anche questo studio dimostra come le carni RTE refrigerate costituiscano un ottimo substrato favore alla crescita del patogeno. Analizzando l'efficacia delle tre batteriocine si può affermare che la loro applicazione sulla superficie del prodotto garantisce un'ottima inibizione della crescita del patogeno. La Nisina esplica il suo effetto fino a sei settimane, a cui segue un ingiustificato aumento della concentrazione del patogeno, mentre le due nuove batteriocine caratterizzate garantiscono un controllo fino a dieci settimane, il che le rende estremamente efficaci anche considerando che la loro attività anti-*Listeria* viene mantenuta ottimale ad un pH compreso tra 2 e 8, mentre risulta inibita a valori superiori a 11.

Considerando che l'impiego delle batteriocine è giustificato nei terreni favorevoli alla crescita del patogeno, è sufficiente che il loro range di attività, considerando il pH, sia compreso in quello favorevole alla crescita del patogeno, in questo caso pienamente soddisfatto. Come per

altre batteriocine analizzate, anche in questo caso è notevole la resistenza al calore, infatti risultano entrambe stabili fino a 100°C per 30 minuti, mentre un trattamento a 121°C per 15 minuti, ne riduce solo in parte l'attività.

Un altro aspetto importante da considerare è che le tre batteriocine analizzate, utilizzate singolarmente, sono state in grado di inibire cinque ceppi patogeni di *L. monocytogenes* miscelati in parti uguali, ciò significa che ogni ceppo risulta sensibile ad ogni batteriocina, diversamente nel primo studio analizzato dove sui cinque ceppi di LAB, solamente due surnatanti risultavano attivi contro ogni ceppo utilizzato. Ciò evidenzia che esistono batteriocine con uno spettro d'azione relativamente più ampio rispetto ad altre, e come la combinazione di più batteriocine in miscela tra loro garantisca in ogni caso una migliore azione contrasto alla crescita del patogeno.

## 5. Conclusioni

*Listeria monocytogenes* rappresenta attualmente la principale zoonosi in Europa per tasso di ospedalizzazione, numero di morti e letalità, come evidenziato nel report ECDC del 2020.

La patologia che provoca, chiamata listeriosi, è una tossinfezione alimentare, gli alimenti prevalentemente coinvolti appartengono alla categoria “ ready to eat”, in quanto, essendo pronti per il consumo, non necessitano di trattamenti termici dopo l’acquisto da parte del consumatore finale.

Risultano di fondamentale importanza quelli che vengono conservati in refrigerazione, infatti, in presenza di altri parametri intrinseci favorevoli alla crescita, date le spiccate tendenze psicrotrofe del batterio, ne permettono la crescita e lo sviluppo nel range di temperatura di conservazione degli alimenti RTE refrigerati, ovvero tra 0°C e 4°C, tenendo presente che nei frigoriferi domestici non sempre viene garantito il corretto mantenimento della temperatura.

I dati riportati sui trend di consumo dimostrano come la diffusione di questi alimenti sia sempre più elevata e in crescita, e come rappresentino sempre di più una parte della comune dieta della maggior parte dei consumatori.

Il fatto che le categorie di alimenti maggiormente interessate da listeriosi siano proprio alcuni cibi RTE, e la diffusione relativamente elevata del batterio in vari ambienti, soprattutto quelli di trasformazione dell’industria alimentare, fondano le basi per migliorare le strategie di controllo di questo patogeno, al fine di ridurre il rischio di tossinfezioni alimentari.

L’obiettivo di inibire la crescita del batterio nei substrati alimentari che ne favoriscono lo sviluppo è possibile impiegando alcuni metaboliti dei batteri lattici, le batteriocine.

La loro efficacia tramite l’applicazione negli alimenti durante il processo produttivo, quindi prima della commercializzazione e l’inizio della shelf life, risulta ampiamente dimostrata, soprattutto quando vengono utilizzati i surnatanti privati delle cellule o i concentrati purificati. Diversamente, l’utilizzo di colture protettive in prodotti RTE risulta di scarso interesse in quanto la bassa temperatura di conservazione non garantisce una adeguata produzione di batteriocine da parte dei LAB, in quanto ne inibisce fortemente la crescita.

Per garantire un’ottimale controllo del patogeno risulta fondamentale l’impiego di un mix di batteriocine, in quanto si è notato come l’impiego di una singola batteriocina non garantisce l’azione inibente verso ogni singolo ceppo di patogeno, diversamente, nelle prove analizzate in cui è stata utilizzata una miscela di due o più batteriocine, l’attività inibitoria era evidente in ogni ceppo.

Un aspetto rilevante a favore dell'impiego di queste sostanze risulta il profilo tossicologico, in quanto, nelle batteriocine più studiate, come la nisina, secondo gli studi presi in considerazione, non sono mai stati osservati effetti di tossicità cronica, cioè i possibili danni a lungo termine in seguito all'assunzione di dosi relativamente basse di sostanze con frequenza elevata, mentre la tossicità acuta, si manifesta con l'assunzione di quantità estremamente elevate di sostanza, per la nisina oltre 6 gr/kg di peso corporeo, questo le rende sostanze sicure per la salute dei consumatori.

Una limitazione importante sull'utilizzo di queste sostanze risulta l'utilizzo dei concentrati purificati, infatti, attualmente, solo la nisina è autorizzata in tale impiego, e questo limita la possibilità di utilizzare questa tecnica per controllare il patogeno.

L'impiego dei concentrati come additivi risulta più immediato e semplice nell'utilizzo, rispetto ai surnatanti privi di cellule, quindi, data l'ottima efficacia di queste sostanze, l'ulteriore studio e caratterizzazione di nuove batteriocine da impiegare come additivi negli alimenti a rischio listeriosi andrebbe ad ampliare gli strumenti di cui dispone l'industria alimentare per ridurre il rischio che *L. monocytogenes* possa raggiungere negli alimenti concentrazioni tali da provocare listeriosi nei consumatori.

## Bibliografia

Akihiro H., Norio I., Hironao N., Yosuke T., Mayumi K., Fumio F., Joss D., Kazuo Y., Shim-Mo H., June 2010. *A 90-day oral toxicity study of nisin A, an anti-microbial peptide derived from Lactococcus lactis subsp. lactis, in F344 rats*. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. Doi: 10.1016/j.fct.2010.06.002.

Allende A., Martínez B., Selma V., Gil María I., Suárez, Julian E., Rodríguez A., October 2007. *Growth and bacteriocin production by lactis acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing Listeria monocytogenes in vitro and in fresh-cut lettuce*. Food Microbiology. Volume 24. Doi: 10.1016/j.fm.2007.03.002.

Cecchini S., Palombo B., Briscolini S., Lanciotti M., Gattuso A., Gianfranceschi M. V., Loschi A. R., Blasi G., February 2011. *Genotypic typing and biofilm formation of Listeria monocytogenes strains in the industry of frozen food products. Preliminary results*. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche. Webzine Sanità Pubblica Veterinaria numero 64. ISSN 1592-1581.

European Foods Safety Authority. <https://www.efsa.europa.eu/it>.

European Center For Disease Prevention And Control. Listeriosis Annual Epidemiological Report for 2017.

FreshCut News, il settimanale della quarta Gamma, articolo " Primo quadrimestre: vola negli usa la IV Gamma di verdura e di frutta", 4 giugno 2021.

Juan J. Q., Alvaro., Carla P. G., Charlotte D., Francisco G., Graciela P., Alvaro D. O., October 2021. *Pathogenicity and virulence of Listeria monocytogenes: A trip from environmental to medical microbiology*. Taylor e Francis Online, Virulence. Volume 12. Doi: 10.1080/21505594.2021.1975526.

L. G. Tilney, D. A. Portnoy, October 1989. *Actin filaments and growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, Listeria monocytogenes*. JCB, Journal of Cell Biology. Doi: 10.1083/jbc.109.4.1597.

Lihui D., Fang L., Ping Z., Tong Z., Micheal P. Doyle, December 2017. *Characterization of Enterococcus durans 152 bacteriocin and their inhibition of Listeria monocytogenes in ham*. Food Microbiology. Doi: 10.1016/j.fm.2017.07.002

Paul Priyesh V., Peter M. Muriana, March 2017. *Inhibition of Listeria monocytogenes on Ready-to-Eat Meats using bacteriocin mixtures based on mode-of-action*. Foods. Doi: 10.3390/foods6030022.

Rapporto COOP 2019, Articoli " Nel carrello è sempre più instant food" e " In fuga dai fornelli", 2019.

Regolamento (CE) N. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.

Rivista Fresh Plaza, Articolo "Negli Stati Uniti la quarta gamma vola", 14 febbraio 2022.

Todd R. Klaenhammer, 1993. *Genetics of bacteriocin produced by lactis acid bacteria*. Department of Food Science, Dairy Foods Research Center, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA. Doi: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x

Ying H., Yunbo L., Zhengyuan Z., Hongxing Z., Chaoxiang Y., Hongtao T., Zheng L., Jiannan F., Hui L., Yanling H., November 2009. *Characterization and application of an anti-Listeria bacteriocin produced by Pediococcus pentosaceus 05-10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China*. Food Control. Volume 20. Doi: 10.1016/j.foodcontrol.2008.12.008.