



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E SICUREZZA DEGLI
ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

Direttore: Prof. Giovanni Garippa

INDIRIZZO: Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale (XXV CICLO)
(coordinatore: prof. Enrico De Santis)

STUDIO DELLA CONTAMINAZIONE DA *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN CASEIFICI OVINI INDUSTRIALI

Docente Guida

Chiar.mo Prof. Enrico P.L. De Santis

Direttore

Prof. Giovanni Garippa

Tesi di dottorato della

Dott.ssa Elia Mura

ANNO ACCADEMICO 2011 - 2012

INDICE

ABSTRACT.....	2
<i>Premessa</i>	4
INTRODUZIONE.....	9
<i>Il genere Listeria</i>	11
<i>Listeria monocytogenes</i>	14
<i>Classificazione in sierotipi</i>	17
<i>Ecologia e habitat di Listeria spp. e Listeria monocytogenes</i>	24
<i>Contaminazione nei caseifici ovini industriali</i>	28
<i>Formazione di biofilm</i>	30
<i>La Listeriosi</i>	39
<i>Fattori di virulenza e patogenesi</i>	43
<i>Manifestazioni cliniche</i>	54
<i>Sintomatologia nell'uomo</i>	54
<i>Epidemiologia</i>	59
<i>Esposizione del Consumatore</i>	61
<i>Aspetti Normativi</i>	62
SCOPO E PIANO DELLA RICERCA.....	67
<i>Materiali e metodi</i>	71
<i>Campionamento</i>	72
<i>Caratterizzazione biomolecolare di Listeria monocytogenes</i>	82
<i>Definizione della persistenza ambientale di Listeria monocytogenes</i>	86
<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)</i>	88
<i>Analisi dei dati</i>	92
RISULTATI.....	94
<i>Analisi molecolare e studio di popolazione</i>	99
<i>Discussione</i>	101
<i>Conclusioni</i>	105
TABELLE.....	108
BIBLIOGRAFIA.....	116

ABSTRACT

Listeria monocytogenes (*Lm*) is the causal agent of listeriosis, a foodborne disease that exhibits a high mortality rate (20-30%). Listeriosis outbreaks are linked to the consumption of ready-to-eat food and some dairy products have been clearly identified as a primary source of infection. *Lm* post-process contaminations in cheese from thermized/pasteurized milk or in whey cheese can be tracked to the cheese-making plants environment. The present study evaluated *Lm* prevalence and distribution in sheep's cheese factories. In two plants located in Sardinia (Italy) were carried-out 7 sampling, representative of seasonal evolution of the production activities. The samples were collected from the environment (570), from Pecorino Romano (PR) rind (47) and Ricotta salata (RS) surface (32 RS). Each sample was analyzed according to ISO 11290-1:2005. PFGE and multiplex PCR serotyping, were carried out on 70 *Lm* isolates, to track the contaminations to sites from the dairy plants environment. *Lm* prevalence ranged between 23%-12.4% in samples collected from

the environment and 26%-9.5% from PR rind, all RS samples were negative. The most contaminated environmental areas were the washing and the ripening premises. Serotyping generated three serovars: 1/2a, 1/2b, 4b. PFGE analysis allowed to classify the *Lm* isolates into 8 clusters. The same strains were detected in the PR rind and in the environmental surfaces, suggesting a clear route of contamination for *Lm* and its niches into dairy plants.

Premessa

Il settore della trasformazione casearia è ancora oggi intimamente legato alle tradizioni e alla cultura contadina diffuse da secoli nel nostro Paese, e che hanno favorito il proliferare di innumerevoli realtà produttive distribuite capillarmente su tutto il territorio nazionale. Da una produzione legata all'autoconsumo si è poi passati alla situazione attuale dove, accanto a realtà che hanno conservato le tipiche caratteristiche di una produzione artigianale, si sono sviluppati sistemi di produzione industriale.

In Sardegna, l'avvio del processo di industrializzazione del sistema agro-pastorale, è avvenuto tra il tardo '800 e i primi del '900. *«In quegli anni, la massiccia emigrazione di italiani, soprattutto campani, calabresi e siciliani, verso gli Stati Uniti e il Sudamerica determinò una forte domanda d'un formaggio pecorino "rustico", molto saporito e dal gusto piccante. A seguito della crescita "americana" di quella domanda erano sorti, soprattutto nell'agro romano ed attorno al 1890, i primi caseifici "industriali" capaci di produrre, in quantità anch'esse industriali, quel particolare tipo di pecorino piccante*

chiamato dalla zona d'origine "romano". L'indisponibilità continentale delle quantità di latte capaci di soddisfare la crescente domanda proveniente dagli Stati Uniti, avrebbe orientato l'interesse di quegli industriali verso la Sardegna che, diverse descrizioni dei mercanti ponzesi, avevano indicato abitata più da pecore e capre che da uomini», (tratto dal saggio "Avanguardisti della modernità" di Paolo Fadda, 1999).

Gli allevamenti ovini, infatti, hanno rappresentato, e rappresentano tuttora, uno degli assi portanti dell'economia rurale isolana, basti, ricordare, infatti che nella regione sono allevati attualmente circa 3,5 milioni di capi ovini, provenienti da circa 13 mila aziende zootecniche, che rappresentano più del 40% del patrimonio nazionale (Laore 2011; Istat, 2010a; Istat, 2009). La trasformazione industriale del latte ovino, coinvolge 85 caseifici di cui 55 privati (industria casearia) e 30 ad organizzazione cooperativistica (caseifici sociali). Esistono poi delle aziende che trasformano direttamente ed artigianalmente il latte prodotto dal proprio gregge, per promuoverne la vendita diretta. La produzione più rappresentativa, mediamente il 78% dell'intero sistema di trasformazione, è costituita dal Pecorino Romano DOP (Regione Sardegna). Le altre

produzioni riguardano il pecorino sardo dop, il fiore sardo dop, formaggi a pasta molle e soprattutto la ricotta (fresca, salata e stagionata, affumicata). Tra l'altro, il Pecorino Romano DOP è uno dei formaggi italiani più esportati. Nei primi cinque mesi del 2012, le esportazioni sono aumentate del +5.6% rispetto allo stesso periodo del 2011. In crescita sono risultate le destinazioni comunitarie (+25,5%), e, sebbene si tratti di mercati secondari, sono significativamente aumentate le spedizioni verso la Germania (+56%), la Francia (+7,3%) e il Regno unito (+13%),.(fonte Ismea-Laore su dati ISTAT, 2012) il Consorzio per la tutela del formaggio Pecorino Romano ha infatti intenzione di diversificare il mercato per non dipendere soltanto dagli Usa, dove negli ultimi anni si è registrato un progressivo calo della domanda attorno al 38,3%, passando da 209.368 quintali del 2000 a 129.466 quintali nel 2011 (Consorzio per la tutela del formaggio Pecorino Romano, 2012).

Come altre attività agrozotecniche nazionali, anche il settore lattiero-caseario ovino, sta attraversando un momento di crisi. Le cause sono molteplici e, oltre alle tante di carattere tecnico (prezzo del latte, elevati costi di produzione, difficoltà a reperire la

manodopera, infrastrutture spesso inadeguate, ecc.), esistono problemi di carattere sanitario che possono ripercuotersi negativamente anche sulla sicurezza degli alimenti prodotti, qualora vengano contaminati da microrganismi responsabili di zoonosi alimentari. Mai come ora, inoltre, la percezione del rischio da parte del consumatore è stata così elevata e l'opinione pubblica ha riversato un grande interesse verso le infezioni e le tossinfezioni di origine alimentare.

Tra gli agenti di tossinfezione alimentare riveste certamente un ruolo di primaria importanza *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), l'agente eziologico della listeriosi, una malattia a carattere zoonotico che l'uomo contrae usualmente a seguito dell'ingestione di alimenti contaminati. Gli alimenti più frequentemente associati alla trasmissione di *L. monocytogenes* sono quelli pronti per il consumo (ready to eat foods, RTE), tra cui sono compresi i prodotti lattiero-caseari. Nei prodotti caseari, in particolare, è stato evidenziato come le possibilità di contaminazioni ambientali siano strettamente correlabili al tipo di prodotto ed alle caratteristiche fisico-chimiche e

strutturali della crosta che possono favorire od inibire l'insediamento di *L. monocytogenes*.

Nel 2012 negli Stati Uniti proprio un prodotto la ricotta salata, importata dall'Italia è risultato implicato in un'epidemia di listeriosi, che ha coinvolto 14 stati, con 22 persone infettate e 20 ricoverate, provocando 4 morti (CDC, 2012; FDA, 2012). In seguito all'allarme negli USA, anche nella Comunità Europea, Il 3 ottobre è stata notificata nel portale RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) un'allerta (notification detail – 2012.1395) per “*Listeria monocytogenes* (presence/25g) in ricotta cheese from Italy” (RASFF, 2012).

La presenza di *L. monocytogenes* nei prodotti lattiero-caseari determina, quindi, notevoli implicazioni di ordine sanitario ed economico, suscitando l'interesse delle Autorità Sanitarie competenti, degli operatori del settore alimentare (OSA) e degli enti di ricerca, in merito alle strategie di controllo delle contaminazioni di questo patogeno negli stabilimenti e quindi nei prodotti finiti.

INTRODUZIONE

La listeriosi è stata definita dalla WHO (World Health Organisation) una grave tossinfezione alimentare, relativamente rara, ma preoccupante per l'alto tasso di mortalità (20-30%), e di ospedalizzazione (90%) (FAO/WHO, 2004).

Fino agli anni '80 i casi di listeriosi segnalati risultavano scarsi, successivamente il microrganismo ha assunto un ruolo di primo piano come agente di gravi infezioni alimentari, in seguito ad alcune clamorose epidemie, verificatesi nei due decenni successivi in America e in Europa (Griffiths, 2002). Attualmente, nei paesi occidentali, la malattia sta assumendo sempre più una dimensione problematica per la sanità pubblica, sia per la sua potenziale gravità sia per il fatto che epidemie si sono manifestate recentemente. Tale situazione è il risultato della complessa interazione di differenti fattori, che riflettono importanti cambiamenti nelle abitudini sociali, quali:

- miglioramenti attuati dai Paesi maggiormente sviluppati negli ultimi 50 anni nell'ambito della medicina, della sanità pubblica, della nutrizione;

- aumento del numero di soggetti immunocompromessi, quali malati di AIDS, pazienti oncologici e sottoposti a trapianto (Walther F., 2000);
- cambiamenti nelle pratiche di produzione e distribuzione degli alimenti, con enorme diffusione della refrigerazione;
- aumentato utilizzo di alimenti RTE, pronti per il consumo.

In particolare gli alimenti pronti al consumo (RTE, ready to eat) sono maggiormente associati alla listeriosi, in quanto non prevedono una preventiva preparazione aggiuntiva (ad es. la cottura). Essi hanno conquistato in breve tempo ampie fette di mercato grazie alla loro praticità d'utilizzo e rappresentano una delle più importanti innovazioni tecnologiche odierne in campo alimentare. Le nuove tendenze nel settore alimentare vedono un consumatore sempre più esigente in termini di qualità, ma nel contempo sempre più attratto da alimenti funzionali e pratici all'utilizzo. Secondo un recente rapporto globale presentato dal GIA (Global Industry Analyst), il mercato dei piatti pronti al consumo supererà gli 81 miliardi di dollari entro il 2015.

Il genere Listeria

Il genere *Listeria spp.* è compreso nella famiglia delle *Listeriaceae* e nell'ordine *Bacillales* (con altre importanti famiglie di batteri in particolare quella delle *Staphylococcaceae*), che fa capo alla Classe III (Bacilli), ed al Phylum XIII Firmicutes (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition, vol. III (The Firmicutes), 2009; Ludwig et al, 2010). Attualmente, secondo il National Center for Biotechnology Information Taxonomy Database (NCBI) nel genere *Listeria spp.* vengono comprese dieci specie, di cui quattro di recente descrizione: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* (*subsp. ivanovii* e *subsp. londoniensis*), *L. grayi*, *L. welshimeri*, *L. rocourtii* (Leclercq et al., 2010) e *L. marthii* (Graves et al., 2010), *L. fleischmannii* (Bertsch et al., 2012) e *L. weihenstephaensis* (Lang Halter et al., 2012). *L. grayi* mostra caratteristiche differenti da quelle delle altre specie del genere *Listeria* (Orsi et al., 2011; Vaneechoutte et al., 1998; Boerlin et al., 1991; Seeliger et al., 1986). In passato, infatti, alcuni ricercatori avevano proposto di inserire le specie *L. grayi* e *L. murrayi* in un nuovo genere, denominato *Murraya* (Tiecco, 1991; Welshimer et al., 1974).

Attualmente *L. grayi* è considerata identica a *L. murray* (Robinson *et al.*, 2000) in base all'analisi della sequenza del 16S rRNA, , continua ad essere collocata nel genere *Listeria spp.* (Sauders *et al.*, 2012). Attualmente, solo *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* sono considerate specie patogene. *L. monocytogenes* causa una grave malattia di origine alimentare nell'uomo, la listeriosi, ma è anche in grado di provocare infezioni invasive negli animali (meningiti e aborti). *L. ivanovii* provoca, invece, prevalentemente infezioni nei ruminanti, principalmente ovini e caprini, caratterizzate per lo più da episodi di meningoencefalite e/o aborto nelle pecore gravide, ma è stata anche associata, seppur raramente, con infezioni nell'uomo (Guillet *et al.*, 2010; Cummins *et al.*, 1994). *L. seeligeri* e *L. welshimeri* solo raramente sono causa di malattia negli animali, mentre *L. grayi* e *L. innocua* sono considerate non patogene (Lovett *et al.*, 1987; Pini and Gilbert *et al.*, 1988). In bibliografia si trovano rare segnalazioni di casi di listeriosi animale sostenuti da *L. innocua* (McLauchlin *et al.*, 2004). Tradizionalmente i membri del genere listeria vengono classificati in specie "tipicamente emolitiche". Tra le specie emolitiche su agar addizionato di sangue ovino sono comprese *L.*

monocytogenes, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*. Le altre specie risultano non emolitiche. *L. seeligerii*, specie considerata non patogena, comprende isolati sia emolitici che non emolitici. I ceppi emolitici presentano un omologo del gene *prfA*, gene che codifica uno dei principali fattori di virulenza di *L. monocytogenes* e di *L. ivanovii* (Sauders et al., 2012). *L. monocytogenes* è correlata alla *L. innocua* e *L. marthii*, ed è interessante notare come ciascuna delle due specie patogene siano strettamente correlate dal punto di vista genetico a specie non patogene; (Graves et al., 2010;). I microrganismi che appartengono al genere *Listeria* sono gram positivi, non sporulati, anaerobi facoltativi (Snehal Jadhav et al., 2012; Wong and Freitag 2004), e mostrano strette relazioni filogenetiche rispetto ai generi *Lactobacillus* e *Streptococcus* (Swaminathan B., 2001).

Listeria monocytogenes

L. monocytogenes è un batterio intracellulare facoltativo, gram positivo, aerobio e anaerobio facoltativo (microaerofilo), non sporigeno, privo di capsula, di forma bastoncellare e con tendenza al pleomorfismo; questa caratteristica permette di osservare il batterio sotto forma allungata e filamentosa o cocco-bacillare. In colture di 24h *L. monocytogenes* si presenta come un corto bacillo con estremità arrotondate (diametro 0,4-0,8 μm , lunghezza 1-2 μm). In colture di 2-5 giorni l'aspetto è allungato e filamentoso. All'osservazione al microscopio ottico *L. monocytogenes* si presenta con una tipica disposizione "a palizzata". Quando coltivato a 20-25°C è mobile grazie alla presenza di flagelli peritrichi (da 1 a 5), che conferiscono al microrganismo un movimento caratteristico, definito "rototraslatorio". La motilità scompare, invece, quando *L. monocytogenes* viene incubata a 37°C. Su agar nutritivo forma, in 24-48 ore, a 37°C delle colonie di diametro compreso tra 0,5 e 1,5 mm, traslucide con riflessi bluastri se osservate in controluce. La temperatura ottimale di crescita è tra i 30 e i 37°C (Rocourt et al., 2000), con range compreso tra 0 e 45°C. La crescita alle basse

temperature rappresenta una delle caratteristiche fisiologiche di maggiore interesse e consente di annoverare *L. monocytogenes* tra i microrganismi psicrotrofi (Gandhi et al, 2007). La pastorizzazione o la termizzazione assicurano l'inattivazione di un elevato numero di cellule di *L. monocytogenes* ($D_{71,7}$ 0,8-1,1" e $D_{66,1}$ 6,2-10,1") (ICMSF, 1996; IDF 392/2004). L'inattivazione del microrganismo si ottiene, comunque, a temperature superiori a 50°C (Swaminathan B., 2001). In presenza di temperatura ottimale di sviluppo si moltiplica in un range di pH tra 4,4 e 9,6 con optimum a 7,1 Il valore di a_w che costituisce il limite inferiore per lo sviluppo è compreso tra 0.90 e 0.92 (Gandhi et al, 2007, International Standard–ISO 11290-1, 1996). E' alotollerante e riesce a moltiplicarsi con concentrazioni di NaCl tra 6 e 10% (International Standard–ISO 11290-1,1996), tale alofilia aumenta con il diminuire della temperatura (Gandhi et al, 2007). Dal punto di vista biochimico *L. monocytogenes* è un batterio catalasi positivo e ossidasi negativo (Gualandi et al., 2004), non riduce i nitrati, non produce idrogeno solforato, fermenta glucosio, fruttosio, mannosio, galattosio, cellobiosio, trealosio e saccarosio con conseguente produzione di acidi (Donnelly et al., 1992; International

Standard–ISO 11290-1, 1996). *L. monocytogenes* presenta attività emolitica che è possibile valutare evidenziando, attraverso una stretta zona di β -emolisi, su agar arricchito con sangue ovino, la produzione di una β -emolisina, meglio conosciuta come listeriolisina-O (LLO), che è il suo principale fattore di virulenza (Tabella 1). Pur essendo asporigeno e privo di capsula, notevole è la capacità di *L. monocytogenes* di resistere a condizioni ambientali sfavorevoli. Sollecitazioni subletali quali variazioni di pH, A_w , temperatura ambientale come anche esposizione eccessiva ad antibiotici, processi tecnologici di trattamento e conservazione degli alimenti inducono modificazioni delle caratteristiche fisiologiche, genomiche e persino morfologiche del batterio in misura più o meno importante a seconda dello stadio vitale in cui esso si trova. La maggiore capacità di resistenza si riscontra nei batteri in fase di crescita stazionaria (VBNC: Viable But Not Culturable cell) rispetto alla maggiore sensibilità che gli stessi dimostrano in fase logaritmica di crescita (LOG). *L. monocytogenes* quindi, grazie a queste strategie di adattamento che le permettono di moltiplicare in condizioni ambientali avverse e di diventare sempre più antibiotico-resistente.

Tabella 1. Identificazione del genere *Listeria*

Specie	β -emolisi	Xylosio	Ramnosio	Metyl-mannoside	Ribosio	Mannitolo
<i>L. monocytogenes</i>	+	–	+	+	–	–
<i>L. innocua</i>	–	–	v	+	–	–
<i>L. ivanovii</i> subsp <i>ivanovii</i>	+ ^a	+	–	–	–	+
<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>londoniensis</i>	+ ^a	+	–	v	–	–
<i>L. seeligeri</i>	+	+	–	–	–	–
<i>L. welshimeri</i>	–	+	v	+	–	–
<i>L. grayi</i>	–	–	v	+	+	+
<i>L. marthii</i>	–	nd	nd	nd	nd	nd

+ = positivo^a = areadi emolisi più ampia

– = negativo

Vv= variabile

nd = non determinato

Classificazione in sierotipi

L. monocytogenes può essere classificata in base all'appartenenza ad uno dei 4 sierogruppi (indicati come 1/2, 3, 4 e 7) sinora individuati. Tale classificazione si basa sulla presenza di 15 antigeni somatici O, stabili al calore (acidi teicoici), identificati con un numero da I a XV, e 5 antigeni flagellari H (A, B, C, D, E) sensibili al calore (Fabbi et al., 2005). Tali sierogruppi sono suddivisi a loro volta in tredici sierotipi: 1/2a, 1/2b,

1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e ed infine 7 (Tabella.2.) (Wiedmann, 2002). I diversi sierotipi possono determinare infezione negli animali a sangue caldo e i sierotipi 1/2a, 1/2b e 4b sono i più frequentemente isolati (Wiedmann M., 2003). I ceppi di *L. monocytogenes* isolata da episodi di listeriosi umana appartengono prevalentemente ai sierotipi 1/2a, 1/2b e 4b e rappresentano il 95% degli isolati da casi clinici di listeriosi epidemica o sporadica (Graves, Swaminathan, & Hunter, 2007). Tra questi il sierotipo 4b è quello più comune nei casi epidemici di listeriosi umana, mentre i sierotipi 1/2b e 1/2a sono responsabili di casi sporadici di infezione (Ryser, 2003). Uno recente studio, riguardante la distribuzione dei sierotipi in Italia, ha riscontrato un aumento dei casi associati al sierotipo 1/2a e una diminuzione di quelli associati al sierotipo 4b, rispetto al decennio 1990-99. Tale cambiamento nella frequenza di isolamento è stato evidenziato anche in altri Paesi europei (Finlandia, Gran Bretagna, Svizzera, Danimarca e Svezia) ed extra-europei. Di 1363 ceppi di *L. monocytogenes* isolati in infezioni umane in Gran Bretagna, il 15% appartenevano al sierotipo 1/2a, il 10% all'1/2b e il 64% al sierotipo 4b (Wiedmann M., 2003; Mc Lauchlin, 1990). In

particolare i ceppi appartenenti ai sierotipi 1/2b e 4b isolati durante le epidemie di listeriosi, possono essere classificati in due gruppi omogenei, strettamente correlati tra di loro ed identificati come “cloni epidemici” (Norrung et al., 1993; Wiedmann, 1997; Boerlin et al., 1991). *L. monocytogenes* è geneticamente eterogenea e per effettuare una corretta indagine epidemiologica, in caso di focolai epidemici, è necessario individuare i vari cloni. Preliminarmente occorre che i ceppi vengano effettivamente identificati, in genere con metodi fenotipici e molecolari, come appartenenti alla specie di interesse. La collocazione dei ceppi nei vari cloni epidemici è dovuta all’individuazione di specifici markers molecolari (). Il concetto di “clone epidemico” (EC) si riferisce a gruppi di ceppi geneticamente correlati che discendono da un ceppo comune, denominato “common ancestor” (Dicuonzo G., 2004). Questi ceppi possono essere solitamente associati a focolai epidemici che vengono segnalati in tempi e luoghi differenti. Fino ad ora per *L. monocytogenes* sono stati descritti quattro cloni epidemici, EC I, EC II, EC III e ECIV. Tra questi il clone EC I è il più importante e il più studiato, in

quanto è stato associato a molte epidemie di listeriosi in Nord America (stati Uniti e Canada) e in Europa (Snehal Jadhav et al., 2012).

La maggiore virulenza dei ceppi 1/2a, 1/2b e 4b potrebbe essere legata ad alcune caratteristiche particolari: è stato osservato che ceppi appartenenti al sierotipo 1/2a a 4°C sopravvivono alle batteriocine meglio dei ceppi 4b, inoltre presentano maggiore capacità di sopravvivenza durante il passaggio nell'ambiente gastrico e sono in grado di replicarsi nell'alimento con velocità ed intensità maggiore rispetto agli altri sierotipi (Rocourt, 1996; Fabbi et al., 2005). Questo potrebbe spiegare il fatto che i ceppi isolati da alimenti appartengono per la maggior parte al gruppo antigenico 1/2 (1/2a, 1/2b, 1/2c) e sono in maggioranza di sierotipo 1/2a (Rocourt, 1996), mentre gli isolati di sierotipo 4b si riscontrano in genere nel 10-12% degli alimenti contaminati (Fabbi et al., 2005). Al contrario, gli isolati di *L. monocytogenes* appartenenti al sierotipo 4b sopravvivono meglio al trattamento al calore dopo refrigerazione rispetto ai sierotipi 1/2a. Inoltre dopo refrigerazione, i ceppi di sierotipo 4b posti a 37°C sono in grado di replicarsi più velocemente rispetto ai ceppi di sierotipo 1/2a, mostrando talvolta una

patogenicità superiore. Queste caratteristiche giustificano la maggiore capacità patogena per l'uomo dei sierotipi 4b (Fabbi et al., 2005).

Tabella 2. Sierotipi ed antigeni di *Listeria monocytogenes*

Sierotipo	Antigeni somatici O	Antigeni flagellari H
1/2a	I, II, (III)	A, B
1/2b	I, II, (III)	A,B, C
1/2c	I, II, (III)	B,D
3a	II,(III), IV	A, B
3b	II,(III), IV, (XII), (XIII)	A, B, C
3c	II,(III), IV, (XII), (XIII)	B, D
4a	(III), (V), VII, IX	A, B, C
4ab	(III), (V), VII, IX, X	A, B, C
4b	(III), V, VI	A, B, C
4c	(III),V, VII	A, B, C
4d	(III), (V), VI, VIII	A, B, C
4e	(III), V, VI, (VIII), (IX)	A, B, C
7	(III), XII, XIII	A, B, C

Un gran numero di studi filogenetici e di sottotipizzazione hanno, inoltre, dimostrato che i vari ceppi di *L. monocytogenes* formano una popolazione strutturata, composta di linee evolutive divergenti (den Bakker et al, 2008; Gray et al, 2004; Liu et al, 2006b; Nightingale et al, 2005b; Orsi et al, 2008c; Ragon et al, 2008; Ward et al, 2004, 2008). I metodi di tipizzazione molecolare (Multilocus Enzyme Electrophoresis - MEE), Pulsed

Field Gel Electrophoresis - PFGE, Ribotyping, Amplified Fragment Length Polymorphism - AFLP e Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP, hanno confermato l'esistenza di un differenziale potenziale patogeno dei ceppi di *Listeria monocytogenes*, che è stata suddivisa in quattro distinte linee evolutive (Lineages I, II, III, IV), (Brosch et al., 1994; Cai et al., 2002; Fugett et al., 2006; Nadon et al., 2001; Ragon et al., 2008; Wiedmann et al., 1997, Orsi et al., 2011, Hain et al., 2012). La maggior parte dei ceppi di *L. monocytogenes* vengono raggruppati in due linee evolutive (Lineages I e II), identificate per la prima da Piffaretti et al. nel 1989, le altre linee evolutive supplementari (III e IV) sono state identificate e studiate in anni recenti (Rasmussen et al., 1995; Robertset al., 2006; Ward et al., 2008). Nel Lineage I si ritrovano i sierotipi più comunemente associati con casi clinici umani, in particolare i sierotipi 1/2b e 4b, nel Lineage II, invece, i sierotipi isolati con maggiore frequenza sono correlati agli alimenti o all'ambiente, come ad esempio il sierotipo 1/2a (Orsi et al., 2011). Il Lineage III è considerata una divisione tassonomica distinta e comprende sierotipi isolati meno comunemente, quali il 4a ed il 4c (Rasmussen et al., 1995;

Wiedmann et al., 1997; Nadon et al., 2001). Sia nel Lineage III che nel Lineage IV i sierotipi sono stati isolati prevalentemente da ruminanti (Orsi et al., 2011).

Ecologia e habitat di Listeria spp. e Listeria monocytogenes

I batteri appartenenti al genere *Listeria* ed in particolare *L. monocytogenes* sono microrganismi ubiquitari. Se infatti il possesso di specifici meccanismi di patogenicità, ne giustificano la presenza come loro habitat d'elezione all'interno delle cellule eucariotiche, le loro spiccate caratteristiche di resistenza e adattamento a condizioni ambientali sfavorevoli, permettono la loro diffusione negli ambienti più disparati (Figura 1). Da studi condotti negli Stati Uniti, il genere *Listeria* è isolato in oltre il 20% dei campioni provenienti da ambienti rurali, urbani, da allevamenti oltre che da ambienti legati alla produzione e trasformazione degli alimenti (impianti di trasformazione, punti vendita al dettaglio). L'utilizzo di tecniche di caratterizzazione molecolare e sub-tipizzazione applicate agli isolati di varia provenienza ha anche evidenziato che esistono delle associazioni tra alcuni ceppi o specie e determinati ambienti, nell'ambito dei quali gli stessi microrganismi persistono per periodi anche molto lunghi (Sauders et al., 2012). Ad esempio, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* sono più frequentemente isolate da ambienti rurali mentre *L. innocua* e *L. monocytogenes* in

ambienti urbani (Sauders et al., 2012; Wiedmann, 2010). Numerose ricerche hanno dimostrato che *Listeria spp.*, in genere, e *L. monocytogenes* in particolare, possono rinvenirsi in numerose specie animali, selvatiche e domestiche, soprattutto pecore, capre, bovini, alpaca, ma anche molti uccelli, pesci e crostacei (CNSA 2009; La Placa, 2000). In alcuni di questi animali il batterio provoca particolari malattie, come la “malattia della corsa in cerchio” delle pecore e la mastite dei bovini. Una volta guariti, gli animali possono rimanere portatori asintomatici e continuare ad eliminare *L. monocytogenes* con le feci ed il latte. Non sorprende pertanto di trovare così spesso il microorganismo nel terreno, nei fanghi di depurazione, nelle acque superficiali e nella vegetazione. Si ritrova anche nei foraggi insilati dove sia impedita/rallentata la fermentazione lattica (CNSA 2009; Donnelly et al., 1992). La sopravvivenza del batterio nel suolo è stata oggetto di alcuni studi sperimentali condotti da ricercatori inglesi e francesi (Nicholson et al., 2004; Girardin et al., 2005) i quali hanno accertato che la *L. monocytogenes* sopravvive nei liquami liquidi e nelle acque di scolo dell'allevamento per un periodo di tempo superiore a tre mesi, mentre nel letame solido fermentato a

causa dell'eccessivo innalzamento della temperatura, per processi di fermentazione organica, sopravvive per non più di un mese. I tempi di persistenza del batterio vitale sul terreno dopo distribuzione del letame sono simili a quelli riscontrati nei liquami e si prolungano nel periodo invernale per la sua psicrotrofia.

I foraggi insilati, in particolare, rivestono un ruolo fondamentale nell'ecologia di *L. monocytogenes* e vengono da lungo tempo considerati come una delle principali fonti di listeriosi nei ruminanti, ai quali vengono normalmente somministrati, e che, per tale ragione, viene anche chiamata "la malattia degli insilati". Gli animali possono acquisire l'infezione non solo tramite l'assunzione di insilati contaminati, ma anche per contatto diretto con l'ambiente esterno. La successiva diffusione nell'ambiente degli allevamenti è dovuta al fatto che *L. monocytogenes* si rinviene nel contenuto intestinale degli animali e nelle loro deiezioni. L'immissione diretta di queste nei campi o il loro utilizzo per interventi di fertilizzazione organica insieme con le acque superficiali utilizzate per l'irrigazione contribuiscono all'ulteriore diffusione del patogeno nei foraggi e nei vegetali. Le matrici alimentari maggiormente soggette a fenomeni di

contaminazione sono sia i prodotti di origine animale, in particolare formaggi molli, latte crudo o pastorizzato in maniera incompleta, carne pronta al consumo, carne cruda, salumi crudi, pollame crudo, prodotti della pesca e dell'acquacoltura, in salamoia e affumicati, che i prodotti di origine vegetale, in particolare le verdure (The Community Summary Report, 2009). Inoltre, nella diffusione della *L. monocytogenes* alcuni studiosi riconoscono all'uomo oltre che un ruolo attivo, anche un ruolo passivo, quale portatore asintomatico in percentuale variabile tra il 2% e il 6% degli individui sani (Rocourt et al., 2000; Kathariou, 2002).

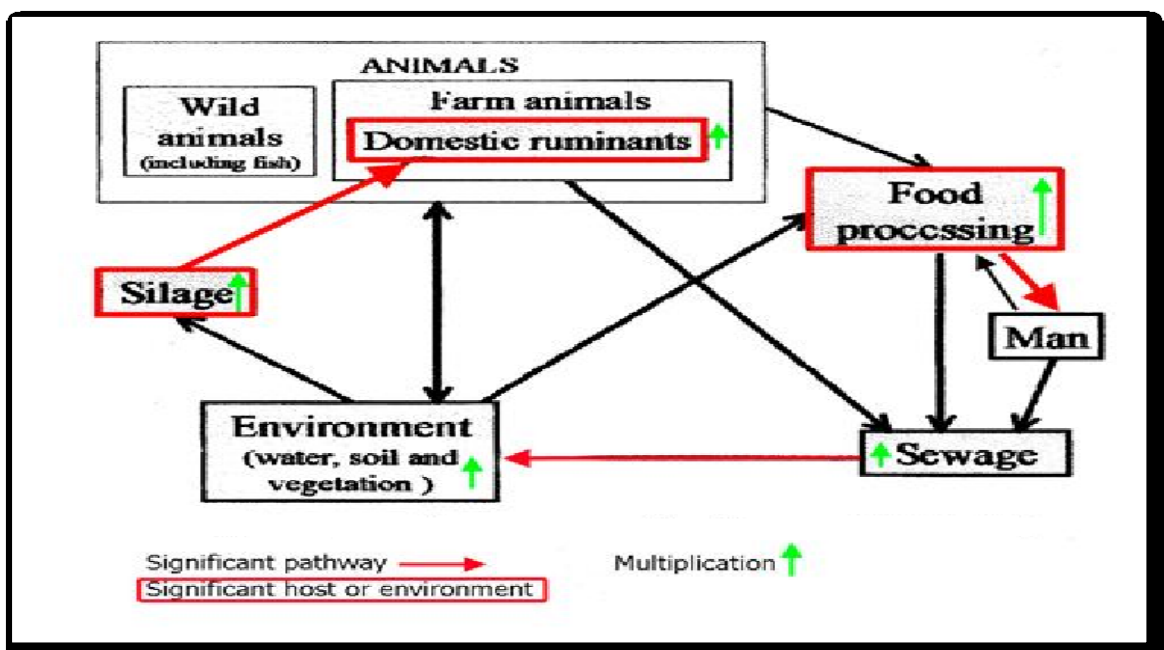


Figura 1. Vie di diffusione e di trasmissione di *L. monocytogenes* tra i vari habitat e ospiti. Modified from Ivaneck, R., et al. 2006. Colors in Diagram above added by Ted Beals. (The Michigan Fresh Unprocessed Whole (FUW) Milk Workgroup topic.

Contaminazione nei caseifici ovini industriali

Gli animali infetti e l'ambiente agricolo contaminato, raramente, rappresentano la fonte diretta di infezione per l'uomo. Più frequentemente avviene invece il passaggio intermedio di *L. monocytogenes* all'interno degli stabilimenti di lavorazione. La colonizzazione di ambienti di lavoro, superfici, attrezzature, operatori, materie prime e prodotti finiti, diventano di conseguenza il principale veicolo di infezione per l'uomo (ADASC, July 1999; Wiedmann M. et al, 2003).

La prevalenza di *L. monocytogenes* nel latte alla produzione è generalmente bassa, con valori che vanno dallo 0 al 6,5% (Gaya et al., 1996; Meyer-Broseta et al., 2003; Van Kessel et al., 2004; Moshtaghi e Mohamadpour, 2007; Hamdi et al., 2007; Kalorey et al., 2008; D'Amico e Donnelly, 2010), e comunque anche nei campioni positivi i valori riscontrati erano generalmente bassi, < 100 ufc/ml (Meyer-Broseta et al., 2003). La maggioranza dei dati disponibili riguardano il latte vaccino, mentre esistono pochi dati sulla presenza di *L. monocytogenes* nel latte crudo ovino. In uno studio effettuato in Giordania è stata riscontrata una prevalenza dell'11,5% (Tahiri et al., 2008).

Negli stabilimenti industriali che trasformano latte di pecora la pastorizzazione o la termizzazione assicurano l'inattivazione di un elevato numero di cellule di *L. monocytogenes* (D71,7 0,8-1,1" e D66,1 6,2-10,1") (ICMSF, 1996; IDF 392/2004). Pertanto, l'isolamento di questo patogeno nel prodotto finito è indice di una contaminazione ambientale post-processo (Wiedmann M., 2003), ed avviene nelle fasi successive alla caseificazione, dalla formatura fino al confezionamento. Il maggior rischio di contaminazione dei prodotti nei caseifici industriali, avviene quando una superficie a contatto con i prodotti stessi è contaminata. Il rischio risulta ancora più elevato nei siti in cui il prodotto viene lavato, salato, conservato e confezionato. Negli ambienti in cui si svolgono le ultime fasi della produzione, prevalgono, infatti, condizioni favorevoli alla persistenza di *L. monocytogenes*, quali elevata umidità e condense, basse temperature ed elevate concentrazioni di NaCl (Lomonaco et al., 2009; Pilo et al., 2007). E' necessario, quindi, effettuare dei campionamenti sia sui prodotti alimentari che su campioni ambientali in modo da permettere l'individuazione delle possibili fonti di contaminazione all'interno del caseificio (De Santis E.P.L. e al.,

2005). Le superfici di lavorazione possono risultare contaminate in seguito a ricontaminazioni successive dovute all'inosservanza delle GMP (Good Manufacturing Practices) e a non appropriate procedure di pulizia e sanificazione e per la persistenza di ceppi resistenti (Afssa 2003). Per diminuire il livello di rischio lo stabilimento deve essere funzionale, quindi dotato di materiali facilmente igienizzabili e sanificabili e di macchinari, destinati a venire a contatto con gli alimenti, facilmente smontabili per effettuare le operazioni di ispezione e pulizia.

Formazione di biofilm

L'eliminazione di *L. monocytogenes* dagli ambienti di lavorazione presenta particolari difficoltà, in quanto ha la tendenza ad aderire a svariate superfici e a formare biofilm; questo rende particolarmente impegnative le operazioni di sanificazione all'interno degli stabilimenti di trasformazione, infatti il biofilm riesce a conferire al microrganismo, una certa protezione nei confronti di detergenti battericidi, di sanificanti e di fattori ambientali stressanti (pH, temperatura, etc).

(www.antropozoosi.it/malattie/tossinfezioni; Swaminathan et al., 2001). Il periodico

distacco di cellule batteriche dal biofilm rappresenta poi una continua fonte di contaminazione degli ambienti di lavoro e quindi degli alimenti.

E' noto che *L. monocytogenes*, una volta entrata all'interno di uno stabilimento risulta di difficile eradicazione per la notevole capacità di adattamento e di sopravvivenza anche in condizioni particolarmente difficili. E' stato riportato da diversi autori che alcuni ceppi di *L. monocytogenes* sono capaci di persistere negli ambienti degli stabilimenti di trasformazione fino a dodici anni (Kovacevic et al., 2012; Wiedmann, 2010; Cataldo et al. 2007; Swaminathan et al. 2007 Holah et al., 2004; Lundén et al.2002; Olsen et al. 2005; Kathariou, 2002; Senczek et al., 2000). Numerosi fattori ambientali quali: temperatura, concentrazione di nutrienti (soprattutto zuccheri semplici, aminoacidi, PO₄) (Moltz & Martin, 2005; Hanna & Wang, 2007), valori di pH, tipologia della superficie di contatto e differente risposta agli stress, per lo più ceppo specifica, possono influenzare la formazione e la quantità di biofilm prodotto da questo microrganismo (Webzine Sanità Pubblica Veterinaria: Numero 64, Febbraio

2011 [<http://spvet.it/>] ISSN 1592-1581). La *L. monocytogenes*, a differenza di altri microrganismi, preferisce formare biofilm in presenza di alte concentrazioni di nutrienti (Stepanovic' et al., 2004). Alcuni autori hanno, anche, dimostrato un effetto sinergico, di glucosio e cloruro di sodio, addizionati a varie concentrazioni, e della temperatura, sulla produzione di biofilm (Pan Y. et al., 2010).

Molti fattori di virulenza, essenziali per l'adesione e l'invasione dei tessuti dell'ospite, sono proteine di superficie che rivestono un ruolo importante anche nell'adesione a superfici abiotiche. Studi recenti (Lemon et al., 2010) hanno evidenziato come il regolatore PrfA svolga un significativo impatto sulla produzione di biofilm da parte di *L. monocytogenes*, descrivendo come i ceppi mutanti non sono capaci di aderire alle superfici o comunque producono un biofilm "difettoso". Studi effettuati sulla produzione di biofilm da parte di ceppi differenti di *L. monocytogenes* mostrano capacità diverse legate al sierotipo e alla velocità di crescita (Pan et al., 2010). Borucki e coll. (2003) hanno dimostrato una maggiore tendenza a formare biofilm nei sierotipi 1/2a e 1/2c di *L. monocytogenes* e nei ceppi isolabili con persistenza dagli impianti di

lavorazione del latte rispetto ai ceppi non persistenti. Per comprendere meglio l'importanza del biofilm si deve considerare che alcuni batteri, in generale, possono essere presenti in due differenti stati: lo "stato planctonico", nel quale le cellule singole e indipendenti si muovono libere in un substrato acquoso, sia essa una superficie di lavoro sia essa un alimento, e lo "stato di biofilm". Il "biofilm" è una matrice biologica attiva, adesa ad una superficie solida, costituita da batteri e da una matrice esopolisaccaridica extracellulare, la EPS (extracellular polymeric substances), da loro prodotta e che li protegge (Robbis et al., 2005). All'interno del biofilm i batteri letteralmente "cambiano abitudini di vita", la loro crescita tende a rallentare e i batteri passano alla fase di vita VBNC (Viable But Not Culturable cell) ossia di crescita stazionaria, di cellula viva, ma non vitale (Giaccone 2008). Si è stimato che le cellule batteriche in stato di biofilm sintetizzano oltre 20 tipi di proteine in più rispetto allo stato di vita planctonico. Molte di queste proteine sono molecole specificamente coinvolte nei meccanismi di resistenza agli stress, alla sintesi di proteine e alle funzioni di omeostasi cellulare, quali le proteine da shock acido o da shock termico (Gandhi et

al., 2007; Hefford et al., 2005). In altri termini, il passaggio dalla condizione di vita planctonica a quello diciamo così "sessile" fa sì che i batteri riescano a sopportare meglio condizioni ambientali disagiati. La caratteristica più importante della formazione del biofilm sta nel fatto che quando i microorganismi formano un biofilm, diventano molto più resistenti anche agli agenti antimicrobici. E tale aumento si concretizza nel giro di poche ore dopo che i batteri hanno aderito alla superficie, e ancor prima che le cellule siano inglobate da una quantità apprezzabile di EPS prodotta da loro stesse (Giaccone 2008).

La formazione di biofilm è, quindi, un processo dinamico e complesso favorito all'interno di impianti industriali dal trasporto meccanizzato degli alimenti per il contatto tra superfici, molecole organiche e microorganismi: il progressivo accumulo di molecole sull'interfaccia liquido-solido determina una maggiore concentrazione di nutrienti favorendo la formazione di un film di "condizionamento" che altera alcune caratteristiche fisico-chimiche della superficie, quali idrofobicità e carica elettrostatica; inoltre la presenza di microscopiche soluzioni di continuità, anche in materiali come

l'acciaio inox e la morbidezza di altri (teflon, gomma) favoriscono la ritenzione di cellule batteriche e materiale organico. Tuttavia è stato dimostrato che per dare origine a un biofilm è sufficiente anche solo quella minima frazione di sostanza organica che è presente nell'acqua potabile e che la superficie di adesione sia almeno lievemente umida.

Si conosce ancora relativamente poco in merito alla metodologia con la quale *L. monocytogenes* forma un biofilm, e in particolare riguardo alla sua capacità di creare biofilm in monocultura. Se comparato ad altre specie microbiche (es: *Salmonella* spp., *Enterococcus faecium*, *E. coli*, *Pseudomonas* spp., ecc.), *L. monocytogenes* è uno scarso produttore di biofilm ma è anche risaputo che negli ambienti naturali è raro trovare biofilm formati da monoculture. Il più delle volte *L. monocytogenes* aderisce a una superficie e dà origine a un biofilm in associazione con altri batteri, anche in base al tipo di flora microbica con cui si trova a condividere l'ambiente. Capita sovente che *L. monocytogenes* si associ a batteri Gram negativi quali *Pseudomonas* e/o *Flavobacterium* spp.; questa convivenza non è assolutamente casuale, si forma perché

L. monocytogenes ottiene dei vantaggi dall'associazione con questi due generi batterici tendenzialmente saprofiti. Bremer e coll. (2001) hanno dimostrato che *L. monocytogenes*, inserita in un biofilm insieme a *Flavobacterium* riesce ad aderire all'acciaio meglio di quanto non faccia quando è da sola. Non solo: le cellule riescono a sopravvivere per tempi più lunghi, quando non sono da sole. Con buona fondatezza di dati si può quindi ipotizzare che questo tipo di associazione microbica stimoli *L. monocytogenes* a sviluppare meglio le sue caratteristiche di resistenza (Giaccone 2008).

I biofilm si possono formare praticamente su qualunque tipo di superficie presente in un'industria alimentare. Le attrezzature più contaminate sono risultate essere i piani di appoggio in acciaio, i nastri di trasporto in teflon, i nastri di trasporto in plastica telata e le ruote/piedini in teflon dei macchinari. *L. monocytogenes* è stata trovata anche su attrezzature sanificate (nastri di trasporto in teflon e contenitori in plastica). Tra le superfici non a contatto, quelle più spesso sede di formazione di biofilm sono i pavimenti e le canalette di drenaggio delle acque. Lievemente meno predisposte

all'adesione di biofilm sono, invece, le pareti dei locali di lavorazione e le superfici interne ed esterne degli apparecchi di lavoro. Ovviamente, gli avvallamenti delle suddette strutture, le fessure e ogni altro tipo di struttura al cui interno si possa avere un accumulo di sporcizia diventano terreno ideale per lo sviluppo di un biofilm, i pavimenti sono uno dei maggiori punti in cui si può trovare *L. monocytogenes* nelle industrie alimentari; nei caseifici, però, i pavimenti sono sempre piuttosto acidi, per la presenza dei residui di siero di caseificazione, eppure il batterio è sovente ancora rinvenibile, verosimilmente per il fatto che esso è riuscito ad adattarsi alle condizioni stressanti imposte dalla lavorazione specifica. Le superfici di lavoro dovrebbero sempre essere costituite da materiali non porosi, tra i quali i più diffusi sono l'acciaio inossidabile e le materie plastiche a elevata durezza. Il legno pur essendo un materiale poroso, è comunque ancora molto utilizzato nei caseifici, in particolare nelle celle di stagionatura, probabilmente perché l'adsorbimento di batteri lattici favorisce la maturazione e la stagionatura dei formaggi e crea nel contempo una flora lattica competitiva nei confronti di *L. monocytogenes*. Secondo Midelet e Carpentier (2002) *L.*

monocytogenes tende ad aderire con maggiore facilità sui polimeri di plastica che sul metallo e ciò vale per tutti i ceppi di listeria considerati. In generale, il batterio dimostra capacità di adesione superiori a quelle di qualsiasi altro microrganismo. Questa capacità comporta uno svantaggio notevole per i produttori di alimenti: quanto più il batterio aderisce facilmente a una superficie tanto più difficile sarà eliminarlo con la sanificazione. In altri termini, la disinfezione contro *L. monocytogenes* è più complessa e difficile nel caso delle superfici in plastica PVC che non in quelle di acciaio. Si è visto, infatti, che le superfici in acciaio inossidabile, lisce, correttamente sanificate, con un pH inferiore a 6, installate all'interno di un ambiente dove la temperatura si mantiene elevata, mentre l'umidità è contenuta, non favoriscono la sopravvivenza di *L. monocytogenes*; al contrario le superfici di lavoro in materiali plastici o resina, invecchiate, sporche, con un pH neutro, sistemate in locali nei quali la temperatura è relativamente bassa, e l'umidità elevata, sono associate in maniera significativa allo sviluppo del microrganismo (Chaitiemwong et al, 2010; Pan et al, 2006; Moltz e Martin 2005; <http://www.afssa.fr/>).

La Listeriosi

La listeriosi è una zoonosi appartenente al gruppo delle malattie trasmesse da alimenti, nel cui ambito, a causa proprio dell'elevato tasso di mortalità (20-30%), riveste un ruolo importante. Nonostante evidenze della malattia siano state descritte fin dalla fine dell'800 in diversi animali, il primo caso umano è stato riportato nel 1929. L'emergenza di questa patologia si è verificata alla fine degli anni 80', quando si sono registrati i primi focolai epidemici associati al consumo di alimenti contaminati. In quegli anni sono stati intensificati gli studi e chiarita l'epidemiologia della listeriosi umana.

La listeriosi è trasmessa prevalentemente per via alimentare. L'evoluzione di questo settore è stata rapida ed importante anche ai fini della maggiore frequenza dei focolai.

La conservazione refrigerata si è progressivamente diffusa e ha caratterizzato l'evoluzione del segmento distributivo, con una progressiva crescente domanda di prodotti ready-to-eat. Con la globalizzazione del mercato alimentare si sono registrati i primi casi epidemici a livello internazionale. Rappresentativi i casi di listeriosi causati

dal consumo di formaggi a latte crudo e da prodotti vegetali, nel 2011, infatti, un esteso focolaio di listeriosi è stato associato al consumo di meloni negli Stati Uniti (CDC, 2011). L'infezione si realizza sia attraverso il contatto diretto o indiretto con secreti ed escreti di animali infetti oppure più frequentemente in seguito all'ingestione di prodotti di origine animale contaminati da *L. monocytogenes*. Gli alimenti più a rischio come fonte di infezione sono generalmente quelli che rientrano nella categoria dei "ready to eat" (pronti al consumo). Gli alimenti pronti per il consumo sono definiti "quei prodotti alimentari destinati dal produttore o dal fabbricante al consumo umano diretto, senza che sia necessaria la cottura o altro trattamento per eliminare o ridurre a un livello accettabile i microrganismi presenti" (Reg. CE n. 2073/2005). Questi prodotti sono rappresentati da latte crudo o pastorizzato in maniera incompleta, formaggi, carne cruda, salumi, alcuni prodotti ittici e prodotti vegetali (Anderson S. Sant'Ana et al., 2012). Nell'uomo, il batterio si comporta da saprofita; il contagio interumano e' raro nonostante sia possibile la trasmissione madre-feto per via trans-placentare o durante il parto. L'infezione fetale può verificarsi per trasmissione

ematogena transplacentare durante la fase di batteriemia materna. in questa fase *L. monocytogenes*, inglobata nei fagosomi dei monociti, nei quali riesce a sopravvivere e a moltiplicarsi , riesce a raggiungere per via ematica il circolo fetale o il liquido amniotico. E' possibile, inoltre, una localizzazione asintomatica nelle vie genitali femminili. L'infezione intrauterina può provocare: parto prematuro, infezione del liquido amniotico, aborto, infezione neonatale, morte neonatale (Gianfranceschi ENTER-NET italia; Norrung et al 2000; Salamina et al. 1996; Dalton et al. 1997; Aureli et al., 1998).

Il tasso medio di mortalità per i casi di listeriosi notificati si attesta mediamente su una percentuale tra il 20 ed il 30 % che sale sino al 38-45 % se riferita ai soli casi di listeriosi che colpiscono pazienti immunocompromessi o anziani. Nell'uomo la possibilità di contrarre la listeriosi è strettamente correlata al contemporaneo verificarsi di alcuni fattori predisponenti legati a soprattutto allo stato immunologico del soggetto, alle caratteristiche patogeniche del ceppo infettante e alla dose infettante.

La dose infettante in grado di determinare episodi di listeriosi in un individuo non può essere quantificata con esattezza ma solo stimata. I valori generalmente indicati sono quelli derivanti dai dati relativi agli isolamenti ed alle quantificazioni di *L. monocytogenes* effettuate negli alimenti responsabili di episodi sporadici o epidemici di listeriosi. Generalmente si ritiene che la dose infettante in grado di provocare la patologia nell'uomo sia compresa tra 100-1.000 UFC/g o ml e 1×10^8 UFC/g o ml. Gli alimenti appena prodotti hanno cariche microbiche di *L. monocytogenes* generalmente molto inferiori alle dosi indicate (tra 0,04 e 10 UFC/g): sono le caratteristiche intrinseche dell'alimento (pH, A_w) associate ad eventuali trattamenti termici ed alle condizioni di conservazione, oltre che al tempo intercorso tra la produzione ed il consumo, che influiscono positivamente o negativamente sulla carica microbica finale dell'alimento stesso.

Assunto che si verificano condizioni predisponenti in termini di dose infettante e patogenicità del ceppo è determinante perché si manifesti la patologia lo stato sanitario dell'individuo. L'appartenenza ad una delle categorie a rischio influisce in

maniera significativa nell'insorgenza della malattia, ma anche gli individui che non vi appartengono ossia quelli definiti come immunocompetenti sono esposti allo stesso rischio seppure in misura minore.

Nei soggetti immunocompetenti o in condizioni non predisponenti l'ingestione di basse dosi di *L. monocytogenes* potrebbe non avere alcun effetto evidente se non lo sviluppo o il potenziamento di una risposta immunitaria protettiva nei confronti del microrganismo. Viceversa, negli stessi soggetti una esposizione orale ad alte cariche batteriche comporta l'insorgenza della patologia in forma non invasiva o invasiva a seconda della virulenza del ceppo coinvolto.

Fattori di virulenza e patogenesi

La virulenza di *L. monocytogenes* è modulata da fattori specifici, alcuni sono implicati nell'adesione ed invasione delle cellule ospiti. Tra i più importanti fattori di virulenza si hanno:

Interrilne: L'interrilina A (*InlA*) e L'interrilina B (*InlB*) sono le più importanti proteine di superficie coinvolte nel meccanismo di adesione e penetrazione cellulare, appartenenti

alla stessa famiglia di proteine in *L. monocytogenes* ne sono state individuate almeno 25 (Figura 2). Esse legandosi a specifici recettori di membrana, inducono il riarrangiamento del citoscheletro cellulare e la fagocitosi nelle cellule bersaglio. *InIA* si lega selettivamente al solo recettore *E-caderina*, delle cellule epiteliali dell'intestino umano, in cui ne attiva la fagocitosi. *InIB* agisce in sinergia con *InIA*, ma interviene nell'invasione di un maggior numero di cellule, in particolare epatociti e fibroblasti, attraverso l'interazione di almeno tre recettori, *Met*, *gC1qR* e glicosamminoglicani (Fabbi et al., 2005; Cossart et al., 2000).

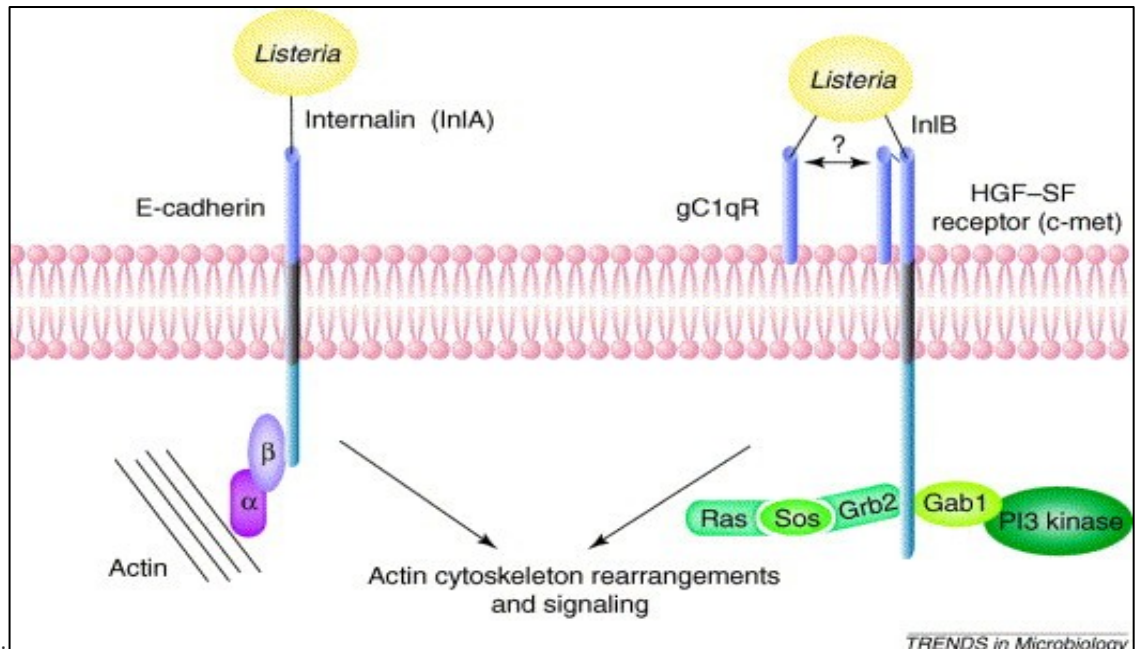


Figura 2 Schema dell'interazione di *Listeria monocytogenes* con cellule di mammifero. Sulla sinistra, internalina interagisce con il dominio extracellulare di E-caderina, il dominio intracitoplasmatico di cui interagisce con β -catenina (β), che si interagisce con α -catenina (α), che a sua volta interagisce con l'actina. Sulla destra, i due leganti di *InIB* sono rappresentati (Cossart, Institut Pasteur)

p60 (*invasion associated protein*): sembra coinvolta in particolare nel processo di invasione dei fibroblasti (Swaminathan, 2001; Mc Lauchlin et al., 2004), e ha un'importantissima funzione nel processo di divisione cellulare, agendo come idrolasi dei costituenti la parete cellulare (Schmid et al., 2005).

Ami: proteina di superficie dotata di attività litica nei confronti della parete cellulare di *L. monocytogenes*, con un importantissimo ruolo nel processo di adesione.

Listeriolisina-O (LLO): opera la distruzione del fagosoma, formando un poro nella membrana, che determina l'innalzamento del pH interno del fagosoma bloccandone la maturazione e permettendo alle fosfolipasi C di dissolverlo (Swaminathan, 2001).

Actina A: il suo ruolo è quello di indurre la polimerizzazione dei filamenti di actina, favorendo la motilità del batterio nel citoplasma delle cellule infette e la diffusione da cellula a cellula.

Fosfolipasi C: favorisce l'uscita dal primo vacuolo fagocitario, in seguito media la dissoluzione della doppia membrana nella diffusione da cellula a cellula (Vazquez-Boland et al., 2001a; Mc Lauchlin et al., 2004).

Regolazione dei fattori di virulenza

I principali geni codificanti (Figura 3) per i fattori di patogenicità sono raggruppati in un cluster di 6 geni, comunemente identificato come **pVGC** (*Virulence gene cluster*) o **LIP 1** (*Listeria pathogenicity island 1*). In tale cluster sono compresi i geni **prfA**, **plcA**, **plcB**, **hly**, **mpl** e **actA** (Vazquez-Boland et al., 2001b; Ward et al., 2004; Schmid et al., 2005). Tutti i geni codificanti per i fattori di virulenza di *L. monocytogenes* sono sotto il controllo trascrizionale del fattore di regolazione **PrfA** (*positive regulatory factor A*), il solo regolatore di virulenza individuato in *L. monocytogenes* (Vazquez-Boland et al., 2001b). I cloni mutanti di *L. monocytogenes* privi del fattore di regolazione, nei quali è soppressa l'espressione dei geni della *Listeria pathogenicity island* e di quelli inIA e inIB, risultano avirulenti (Chakraborty et al., 1992). L'espressione dei fattori di virulenza, dipendenti da PrfA, può essere condizionata da diversi fattori ambientali. Tra i segnali attivanti sono stati individuati valori di temperatura prossimi a 37°C (Swaminathan, 2001) e la presenza di condizioni di stress. L'elevata concentrazione di

ferro e temperature al di sotto dei 20°C sono invece dei fattori inattivanti (Goebel et al., 2000; Kreft et al., 2001).

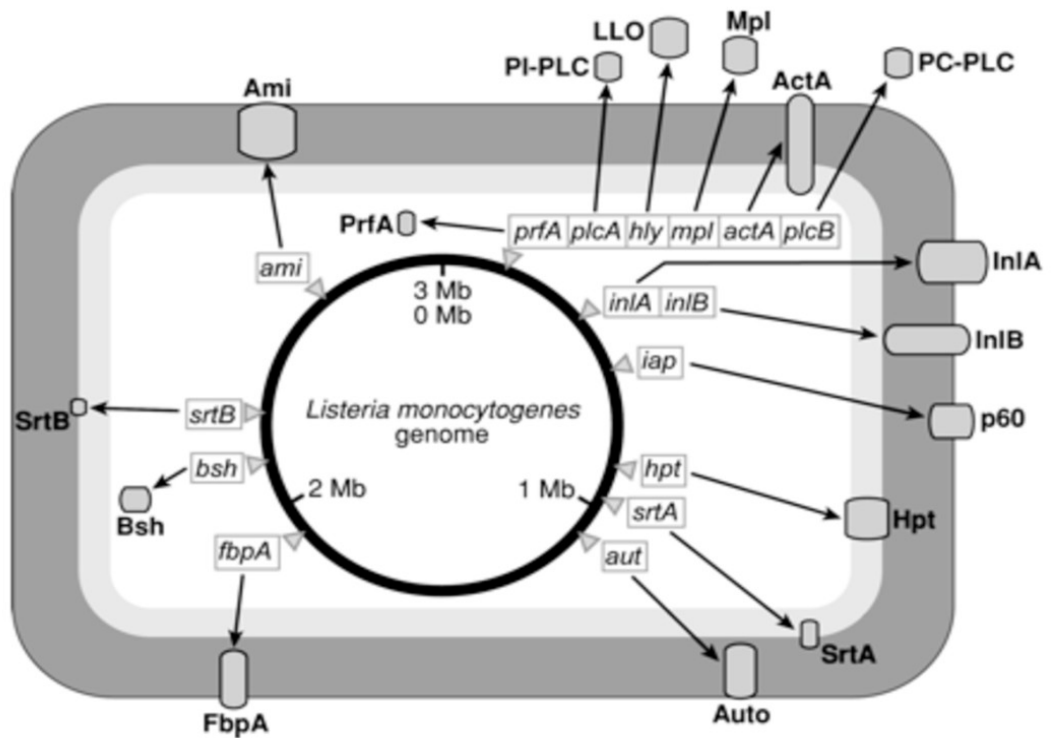


Figura 3. Rappresentazione schematica della cellula di *Listeria monocytogenes* (the Annual Review of Microbiology, Volume 58 2004 (Dussurget et al., 2004) by Annual Reviews www.annualreviews.org)

Patogenesi

Data la grande diffusione di *L. monocytogenes* nei prodotti alimentari e i numerosi dati epidemiologici riportati in bibliografia è ormai accertato che la principale via di penetrazione nell'uomo è quella alimentare. Il processo infettivo evolve in patologia quando il batterio attraversa la barriera intestinale diffonde per via ematica e linfatica raggiungendo inizialmente il fegato, in cui si moltiplica all'interno degli epatociti, e la milza, quindi sempre per via ematica raggiunge gli organi bersaglio secondari: cervello e placenta. Caratteristica di *L. monocytogenes* è proprio la sua capacità di superare le barriere dell'ospite (intestinale, emato-encefalica, materno-fetale), unitamente alla capacità di sopravvivere ai meccanismi battericidi messi in atto dai macrofagi oltreché di penetrare, per la sua natura di patogeno intracellulare facoltativo, all'interno di cellule non necessariamente fagocitiche (epatociti, neuroni, ecc.).

Peculiari sono anche i meccanismi posti in essere da *L. monocytogenes* per sfuggire alle condizioni sfavorevoli dell'ambiente gastrico e sopravvivere nell'intestino umano prima della diffusione intra- ed inter-cellulare. La terapia antiacida assunta da alcuni

soggetti e talvolta lo stesso potere tamponante di alcuni cibi, veicolo stesso di infezione, abbattendo temporaneamente l'acidità gastrica influiscono favorevolmente sulle possibilità di sopravvivenza del patogeno in questi distretti e sono fattori predisponenti affinché si manifesti la patologia o si instauri nell'individuo la condizione di portatore asintomatico (McLauchlin et al., 2004; Rocourt et al., 2000).

Abitualmente però *L. monocytogenes* ricorre ad altri meccanismi enzimatici. Un primo meccanismo adottato dal batterio in condizioni di pH molto basso è il ricorso al sistema della glutammato-decarbossilasi (GAD) che converte una molecola di acido glutammico esterna alla cellula in una di acido gamma-idrossibutirrico (GABA), utilizzando un suo protone interno. Il risultato finale è quello di impegnare un gran numero di protoni diminuendone la loro concentrazione intracellulare, alcalinizzando nel contempo il mezzo esterno considerata la minore acidità del GABA rispetto all'acido glutammico (Olier et al., 2004). Il secondo meccanismo conosciuto, denominato BSH (Bile Salt Hydrolase, idrolisi dei sali biliari), è il sistema enzimatico grazie al quale *L. monocytogenes* è in grado di idrolizzare il legame ammidico dei sali biliari coniugati,

liberando acidi biliari che hanno un potere emulsionante molto inferiore rispetto ai primi e di conseguenza un effetto batteriostatico e battericida molto più basso (Olier et al., 2004). La popolazione batterica che sopravvive a queste condizioni estreme grazie all'utilizzo dei sistemi succitati aderisce all'epitelio intestinale dove una parte penetra negli enterociti ed un'altra per "scollamento" delle gap-junction supera la barriera gastro-intestinale e raggiunge il circolo ematico. Già a questo livello si attiva la risposta immunitaria cellulo-mediata dell'individuo infettato ad opera dei linfociti T citotossici. *L. monocytogenes* è in grado di infettare e sopravvivere all'interno di diverse cellule eucariotiche tra le quali enterociti, macrofagi, epatociti, neuroni e fibroblasti inducendo la fagocitosi come già detto anche in cellule prive di tale vocazione. Il processo di internalizzazione definito di tipo "zipper" prende l'avvio da un'iniziale giustapposizione delle due membrane plasmatiche, batterica e cellulare, seguita dalla progressiva interazione tra specifiche proteine batteriche di superficie, InIA e InIB, e i loro rispettivi recettori *E-caderina* e *Met* presenti sulla superficie della cellula bersaglio (Cossart & Toledo Arana, 2008). Il recettore *Met* è coinvolto

nell'interazione con gli epatociti, cellule del primo organo bersaglio in corso di listeriosi (Cossart & Toledo Arana, 2008). Un'altra importante proteina è la p60 (Invasion Associated Protein) che si ritiene sia anch'essa coinvolta nel meccanismo di adesione del batterio alle cellule eucariotiche oltreché nella fase tardiva della divisione cellulare, per la sua attività idrolasica nei confronti della mureina (Vasquez-Boland et al., 2001).

La permanenza della *L. monocytogenes* all'interno del fagosoma ha una durata media non superiore a 30 minuti, durante i quali per un verso si attiva per impedire l'azione battericida della cellula ospite grazie alla sintesi di una superossido dismutasi (MnSOD) per l'altro sintetizza altri fattori di virulenza volti alla disgregazione del fagosoma stesso. Intervengono nella distruzione del vacuolo litico la Listeriolisina-O (LLO) e due fosfolipasi: Fosfatidilinositolo-fosfolipasi C (PlcA) e Fosfatidilcolina-fosfolipasi C (PlcB) (Cossart & Toledo Arana, 2008). La listeriolisina O è una tossina batterica appartenente alla classe delle proteine tiolo-attivate, che attaccandosi alla membrana del fagosoma induce in essa la formazione di pori, con conseguente alterazione degli equilibri ionici e successiva disgregazione del fagolisosoma e liberazione del batterio nel citoplasma. In

questo processo la listeriolisina O è adiuvata o dalla PlcA o dalla PlcB. La PlcA interviene nella lisi della membrana singola del fagolisosoma primario, cioè originato a seguito della penetrazione diretta del microrganismo nella cellula ospite, mentre la PlcB contribuisce alla lisi del vacuolo a membrana doppia che si forma nel passaggio della *L. monocytogenes* dalla cellula ospite alla cellula adiacente nel meccanismo di diffusione intercellulare di cui si parlerà più avanti. All'interno del citoplasma della cellula ospite la *L. monocytogenes* si moltiplica attivamente e sintetizza altri fattori di virulenza indispensabili per il completamento del ciclo infettivo (Cossart & Toledo Arana, 2008). Tra questi la proteina ActA espressa sulla superficie batterica attiva un complesso (Arp2/3) che induce la polimerizzazione dei monomeri di actina cellulare in una ramificata rete di filamenti che disponendosi ad un polo della cellula batterica (a formare le cosiddette *comet tail*) ne indirizzano lo spostamento verso la membrana plasmatica della cellula ospite. Essa sotto la spinta di questo movimento batterico protrude verso l'esterno e il conseguente invaginamento della membrana plasmatica della cellula adiacente avvia un nuovo processo di fagocitosi nei confronti dello stesso

microrganismo che lo ha indotto. 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. L'espressione dei geni che codificano per i fattori di virulenza sopra descritti e coinvolti nel processo infettivo di *L. monocytogenes*, è sotto il controllo del regolatore trascrizionale PrfA. L'espressione di questa proteina che promuove la sintesi dei fattori di virulenza (attivatore trascrizionale) è massima a temperature intorno a 37°C mentre si riduce notevolmente a temperature inferiori a 30°C. Ciò è stato spiegato con la scoperta dell'esistenza di segmenti di RNA messaggeri specifici che passando da uno stato di inattività a basse temperature (< 30°C) ad uno di attività ad alte temperature (37°C), attivano la sintesi del PrfA e dunque a cascata la sintesi dei fattori di virulenza. Studi sempre più approfonditi che si avvalgono di nuove tecniche stanno evidenziando l'esistenza di altri fattori di virulenza nonché di ulteriori e sempre più complessi meccanismi di regolazione (Cossart & Toledo Arana, 2008).

Manifestazioni cliniche

Sintomatologia nell'uomo

La listeriosi è una patologia a prevalente trasmissione alimentare che colpisce per lo più soggetti di età superiore a 65 anni, neonati, gestanti e immunocompromessi quali ad esempio pazienti con neoplasie maligne o sotto terapia citotossica, malati di AIDS, diabetici, individui con valvole cardiache o con patologie epatiche o renali. In particolare le gestanti e i malati di AIDS hanno una probabilità rispettivamente di circa venti e trecento volte superiore di contrarre la listeriosi rispetto ad un individuo sano (*Center for Disease Control and Prevention, 2009*). Negli individui giovani o adulti in condizioni predisponenti la listeriosi si manifesta prevalentemente in due forme cliniche principali:

- forma non invasiva: la dose ingerita deve essere alta e le manifestazioni cliniche insorgono entro poche ore dall'ingestione (12-24 ore). La sintomatologia è simile a quella di altre tossinfezioni alimentari con fenomeni del tipo di una gastroenterite febbrile (diarrea, vomito, cefalea e febbre).

➤ forma invasiva o sistemica presenta un periodo di incubazione più lungo, dalle due alle tre settimane, occasionalmente fino a tre mesi, e la dose infettante è bassa. Si manifesta in seguito a penetrazione e moltiplicazione del batterio nella mucosa intestinale e successiva diffusione per via ematica al fegato, all'utero gravidico ed al sistema nervoso centrale. Nei primi giorni della malattia i sintomi sono simili a quelli riscontrati in altre tossinfezioni alimentari per la comparsa di diarrea, febbre, nausea e dolori muscolari (Vasquez-Boland et al., 2001; Aureli et al., 2000). Successivamente alla compromissione sistemica, si manifestano emicrania, confusione, irrigidimento del collo, perdita di equilibrio e convulsioni (www.epicentro.iss.it/problemi/listeria/listeria.asp).

Negli adulti, *L. monocytogenes* ha un particolare tropismo per il sistema nervoso centrale, provocando meningiti, meningo-encefaliti, setticemie, ma anche infezioni focali granulomatose a livello oculare, cardiaco, pleuro-polmonare, peritoneale, epatico, urinario (Skogberg et al., 1992). La mortalità della forma meningo-encefalica, considerata una delle forme più temibili di

listeriosi, oscilla tra il 50 e il 75%, e nei casi non letali si hanno spesso reliquati permanenti come paralisi, idrocefalo. Per quanto riguarda la gravidanza la listeriosi, che può insorgere in qualunque momento dell'gestazione, è generalmente asintomatica per la madre o decorre con una sintomatologia vaga analoga a una sindrome simil-influenzale accompagnata da brividi, mal di testa, dolori muscolari e articolari nel periodo da 2 a 14 giorni prima dell'aborto spontaneo (Vasquez-Boland et al., 2001). A seconda dell'epoca del contagio provoca aborto, parto prematuro o sepsi neonatale a causa di un'infezione sistemica generalizzata nota come granulomatosi infantile o listeriosi neonatale. L'infezione che i neonati contraggono durante il parto si trasmette per assunzione attraverso le vie aeree o la via digerente di liquido amniotico o di secrezioni vaginali contaminate e può esordire precocemente con sepsi ed insufficienza respiratoria e circolatoria oppure (meno frequentemente: dal 10 al 15% delle listeriosi perinatali) si verificano episodi di listeriosi tardiva da uno a otto settimane dal parto con sepsi e meningite (Vasquez-Boland et al., 2001).

Ancora meno frequentemente (5% dei casi) l'infezione materna non si trasmette al feto seppur in presenza di batteriemia (McLauchlin et al., 2004)

Listeriosi negli animali

La listeriosi è una patologia che si manifesta in forma sporadica negli animali; raramente assume un andamento epidemico, in funzione delle tecniche di allevamento utilizzate. Viene definita zoonosi o saprozoonosi, in quanto la contaminazione degli animali è per lo più conseguente all'ingestione di vegetali. La malattia, descritta soprattutto negli animali d'allevamento (bovini, piccoli ruminanti), si manifesta con differenti quadri clinici: nervoso, genitale, setticemico.

- Forma nervosa: Si manifesta in forma sporadica in animali di tutte le specie e le età, con sintomi neurologici associati ad una moderata ipertermia. Gli animali si muovono in circolo, sempre nello stesso senso (circling disease), digrignano i denti, mostrano strabismo, opistotono, trisma, paralisi facciale unilaterale. Nonostante il trattamento vanno rapidamente incontro a morte.

- Forma genitale: Si osserva nelle femmine gestanti della maggior parte delle specie domestiche. E' caratterizzata da aborto che si verifica nel corso delle ultime settimane di gestazione.
- Forma intestinale: Si manifesta con un'enterite, osservata più frequentemente in bovini, ovini, equini, carnivori.
- Forma setticemica: Si tratta per lo più di forme neo-natali (<http://www.afssa.fr/>).

I ruminanti possono fungere da portatori asintomatici ed escretori del microrganismo con il latte (Tzora A. et al., 1997). I sierogruppi 1 e 4 sono quelli più frequentemente coinvolti nelle infezioni da *L. monocytogenes* negli animali.

Epidemiologia

Nel Community Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2010 (EFSA Journal 2012), redatto congiuntamente dall'European Food Safety Authority (EFSA) e dall'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), sono stati raccolti ed esaminati i dati forniti da 27 Paesi Membri e da 4 Paesi extracomunitari. La relazione riferisce che nel 2009 sono state segnalate 5.550 epidemie di origine alimentare nella UE, che hanno colpito 48.964 persone e causato 46 decessi. Secondo quanto riferito nel report, i principali agenti patogeni causa di infezioni nell'uomo e riportati sono: Salmonella, Campylobacter, Listeria, E. Coli produttori di verocitotossina, Yersinia, Trichinella ed Echinococco.

Le infezioni da *Listeria monocytogenes* nell'uomo sono leggermente diminuite, 3,2% in meno rispetto al 2009 , con un numero di casi confermati nel 2010 pari a 1.601 (1.645 casi nel 2009). A differenza della diminuzione generale degli altri Paesi, in Italia si è evidenziato un leggero aumento dei casi (1,1%) rispetto al 2009. La Listeria è stata

identificata in diverse specie animali e alimenti pronti al consumo come il pesce affumicato, prodotti a base di carne trattati termicamente e i formaggi.

Nel 2013 l'EFSA analizzerà i risultati di un'indagine di riferimento su scala europea riguardante la prevalenza di *L. monocytogenes* negli alimenti pronti al consumo, tra cui pesce affumicato, prodotti a base di carne trattati termicamente e formaggi a pasta molle e semi-molle, che fornirà informazioni importanti sulla prevalenza del batterio e sui fattori che ne favoriscono la presenza in questi prodotti alimentari ad alto rischio.

In aggiunta a queste attività, l'EFSA e l'ECDC svolgeranno una tipizzazione molecolare congiunta per i ceppi di *L. monocytogenes* presenti nell'uomo e negli alimenti, al fine di individuare il possibile nesso tra i casi umani e il consumo di prodotti alimentari (efsa journal 2012)

Anche se meno frequente nell'uomo rispetto a *Campylobacteriosi* e *Salmonellosi*, la *Listeriosi* ha però un tasso di mortalità del 20-30% (Farber and Peterkin 1991; Mead et al., 1999; WHO/FAO 2004), e colpisce in particolar modo i gruppi vulnerabili come gli anziani (>65 anni). L'Efsa ha stimato che nel 2009 sono state circa 270 le persone

decedute nell'UE per listeriosi, registrando un tasso di letalità del 17% tra quelle colpite dalla malattia. Per quanto riguarda gli alimenti coinvolti, lo studio ha riscontrato per la *Listeria* livelli superiori ai limiti di sicurezza previsti per legge nello 0,3-1,1% di alimenti pronti al consumo, soprattutto nel pesce affumicato, nei prodotti a base di carne sottoposti a trattamento termico e nei formaggi molli (EFSA Journal 2011).

Esposizione del Consumatore

La Food and Drug Administration nella Valutazione del Rischio (2003), ha definito il "Risk Ranking" per le diverse tipologie di alimenti, compresi i prodotti lattiero-caseari. Sono state individuate le seguenti categorie: cibi a rischio basso, moderato, alto e altissimo. I prodotti lattiero-caseari non risultano essere inseriti tra i cibi a rischio altissimo. Il latte crudo non pastorizzato rientra nella categoria degli alimenti ad alto rischio, capaci di determinare un numero di casi di Listeriosi $>5 \times 10^9$ porzioni consumate, e ad esso sono attribuiti $7,1$ casi di malattia/anno $\times 10^9$ per porzioni assunte. Alla categoria degli alimenti a **rischio moderato**, che comprende gli alimenti

che indurrebbero un numero di casi di malattia < 5 ma ≥ 1 per bilione di porzioni consumate, sono stati assegnati i formaggi molli non stagionati, il latte pastorizzato ed i formaggi ad alta percentuale di grassi, per i quali il numero di casi di Listeriosi previsti per porzione è stato stimato rispettivamente in $1,8 \times 10^9$, $1,0 \times 10^9$ e $2,7 \times 10^9$. Tra gli alimenti a **basso rischio**, cioè capaci di indurre un numero di casi di malattia < 1 caso per miliardo di porzioni consumate, sono stati inseriti diverse tipologie di formaggi. In particolare abbiamo i formaggi freschi per i quali il rischio calcolato è di $1,7 \text{ casi} \times 10^{10}$ porzioni; i formaggi semi-molli ($6,5 \text{ casi} \times 10^{12}$ porzioni), i formaggi molli stagionati ($5,1 \text{ casi} \times 10^{12}$ porzioni) ed i formaggi duri ($4,5 \text{ casi} \times 10^{15}$ porzioni) (Food and Drug Administration, 2003).

Aspetti Normativi

La Normativa europea con le ultime emanazioni relative al campo alimentare, ha affrontato questa problematica, sottolineando come “i prodotti alimentari non devono contenere microrganismi, né loro tossine o metaboliti, in quantità tali da rappresentare un rischio inaccettabile per la salute umana” (Reg. CE 2073/2005),

fissando i criteri microbiologici che devono essere rispettati per le diverse categorie di alimenti (Boni et al., 2006). Nei “Consideranda” del Reg. CE 2073/2005, il CSMVSP (comitato scientifico per le misure veterinarie in relazione con la salute pubblica) ha emesso un parere separato sulla *L.monocytogenes*, in cui ha raccomandato di stabilire come obiettivo una concentrazione di tal patogeno, negli alimenti inferiore a 100 ufc/g (Gazzetta ufficiale dell’Unione Europea, 2005). I criteri di sicurezza alimentare impongono un limite non superiore alle 100 ufc/g per gli alimenti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L.m*, diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali. Anche i prodotti con pH = 4,4 o acqua libera = 0,92, i prodotti con pH =5,0 e acqua libera =0,94, i prodotti con un periodo di conservabilità inferiore a 5 giorni sono considerati appartenenti a questa categoria. I destinatari del presente Regolamento sono gli operatori del settore alimentare (OSA) ad esso infatti è affidato il controllo e il rispetto dei criteri microbiologici, durante le diverse fasi della filiera quali lavorazione, fabbricazione, manipolazione, compresa la fase di vendita al dettaglio e della distribuzione. Nella fattispecie gli OSA, hanno il compito di provvedere

che i prodotti alimentari siano conformi ai relativi criteri microbiologici fissati nell'allegato I dello stesso Regolamento. Possiamo affermare quindi che i criteri microbiologici costituiscono un valido strumento attraverso cui l'OSA è in grado di definire l'accettabilità sia dei prodotti in sé che del relativo processo di produzione e quindi validare l'efficacia del sistema HACCP. Inoltre dal punto di vista istituzionale, In considerazione del carattere zoonosico della malattia, trasmissibile per via alimentare, la listeriosi è stata inclusa dal legislatore comunitario nella Direttiva 2003/99/CE, Allegato I, (recepita nell'ordinamento nazionale con il Decreto legislativo del 4/04/06 n° 191/2006) tra le zoonosi e gli agenti zoonotici per i quali sono state stabilite reti di sorveglianza e l'obbligo di denuncia (Regolamento CE n.178/2002 del 28 gennaio 2002: allerta comunitaria). nella nuova rete di sorveglianza The European Surveillance System (TESSy) coordinata dall'ECDC Anche il Reg. 2073/2005 all'articolo 7, nei punti 2, 3 e 4, indica le azioni che l'OSA dovrà adottare nel caso di non conformità: il prodotto o la partita di prodotti sono "ritirati" o "richiamati" in conformità a quanto stabilito dall'art. 19 del regolamento 178/2002. Le reti di sorveglianza, volte a individuare

focolai di infezione e determinarne la causa, permettono di agire sia ritirando i prodotti dal mercato che adottando le necessarie misure nei confronti degli impianti di produzione e informando la popolazione a rischio (Arcangeli et al, 2006). Dal 2010 la listeriosi fa parte del sistema Enter-Net Italia, incorporato nella nuova rete di sorveglianza The European Surveillance System (TESSy) coordinata dall'ECDC. Il sistema Enter-Net Italia si avvale attualmente della collaborazione di una rete di 20 laboratori di riferimento regionali a cui affluiscono i dati dei laboratori periferici. In questa sezione è possibile visualizzare i centri di riferimento dislocati in tutto il territorio nazionale. Recentemente, il 5 Novembre 2010, la Commissione Europea ha emanato una decisione (2010/678/UE) concernente una partecipazione finanziaria dell'Unione Europea a un programma coordinato di sorveglianza sulla prevalenza di *L. monocytogenes* in taluni alimenti pronti, da realizzare negli Stati Membri dell'UE. Tra le categorie di prodotti alimentari pronti, che dovranno essere scelti a caso a livello di vendita al dettaglio, si fa esplicito riferimento ai «formaggi a pasta molle o semi molle, ad eccezione dei formaggi freschi» (art. 2, punto 2, lettera b, 2010/678/UE). La

decisione che tiene conto dei precedenti Regolamenti 2073/2005 e 882/2004, prevede uno schema di campionamento stratificato proporzionale in base al numero di abitanti di ciascuno Stato Membro, mentre per i metodi di ricerca è previsto l'utilizzo delle metodiche ISO.

SCOPO E PIANO DELLA RICERCA

Listeria monocytogenes è un microrganismo patogeno che può essere presente negli alimenti di origine animale e nei rispettivi ambienti di lavorazione (Wiedmann M., 2003). Numerosi studi hanno evidenziato il forte legame esistente tra casi di listeriosi alimentare nell'uomo ed il consumo di prodotti lattiero-caseari, sottolineando il ruolo delle contaminazioni post-processo all'interno dello stabilimento (isolati da latte crudo ≠ isolati dai prodotti) e la presenza di caratteristiche intrinseche dei prodotti, indubbiamente favorevoli per lo sviluppo del microrganismo (Kozak J., et al., 1996). Negli ambienti in cui si svolgono le ultime fasi della produzione, prevalgono infatti condizioni favorevoli alla persistenza di *L. monocytogenes*, quali elevata umidità e condense, basse temperature ed elevate concentrazioni di NaCl (Lomonaco S. et al 2009; Pilo A.L. et al 2007). Inoltre questo è un patogeno in grado di annidarsi e proliferare all'interno di nicchie nello stabilimento e colonizzare in modo persistente gli ambienti di lavorazione in virtù della sua capacità di adesione alle superfici e formazione di biofilm. E' proprio da questi focolai di proliferazione che il batterio è poi

in grado di diffondere e di inquinare materie prime, semilavorati e soprattutto i prodotti finiti pronti per la vendita. Lo studio sulla contaminazione da *L. monocytogenes* lungo la filiera del latte ovino in Sardegna, riveste notevole importanza, non solo ai fini dell'applicazione di buone pratiche igieniche nelle produzioni, ma anche quale fattore di competitività per tutti quei prodotti destinati all'esportazione. Il comparto caseario della Regione Sardegna da sempre si basa sull'economia ricavata dalle esportazioni.

La presente ricerca, svolta presso la Sezione di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari e in due caseifici ovis industriali della Sardegna, si è proposta di effettuare:

- Una valutazione della diffusione di *L. monocytogenes* nell'ambito degli stabilimenti.
- l'individuazione delle principali fonti di contaminazione.
- lo studio della prevalenza su due prodotti tipici
- l'isolamento, l'identificazione e la tipizzazione dei ceppi.
- la caratterizzazione biomolecolare degli isolati.

In particolare l'attività pratica svolta, ha riguardato la valutazione della prevalenza e la distribuzione di *L. monocytogenes* negli ambienti e sulla superficie dei prodotti, in due caseifici industriali di trasformazione del latte ovino. In particolare sono state esaminate sia le superfici a contatto che quelle non a contatto con il prodotto, prelevate da diverse aree dei caseifici, e la superficie di due tipologie di prodotti differenti, tipiche della Regione, un formaggio a lunga stagionatura, il Pecorino Romano a Denominazione di Origine Protetta e un prodotto a base di siero di latte ovino, la ricotta salata e stagionata. Il Pecorino Romano, formaggio a pasta dura con stagionatura superiore ai 5 mesi ottenuto da latte termizzato, non supporta la contaminazione della pasta, sia per le condizioni di processo che per le caratteristiche del prodotto, mentre sono frequenti le segnalazioni di contaminazioni superficiali (De Santis EPL et al., 2005). La ricotta salata, per le sue caratteristiche chimico-fisiche e per la particolare tecnologia di produzione, costituisce invece un substrato favorevole per lo sviluppo di *L. monocytogenes* in seguito a contaminazione post-processo (Pisanu et al., 1992, De Santis EPL et al., 2005). Per questa ragione alcune ricotte ovine, salate e

stagionate, prodotte in Italia sono state in passato (2002) , ma anche di recente (2012) oggetto di ritiro e richiamo dal mercato statunitense a causa della presenza di *L. monocytogenes* (FSIS/USDA). Le analisi di laboratorio sui campioni, erano volte all'identificazione, con metodi colturali e l'isolamento delle colonie con caratteristiche tipiche, di *L. monocytogenes* secondo le metodiche qualitativa e quantitativa UNI EN ISO 11290: 2005 (metodi 1 e 2 rispettivamente), l'esecuzione di test fenotipici e l'identificazione biomolecolare mediante PCR. Su una selezione di isolati è stato inoltre condotto uno studio di popolazione mediante sierotipizzazione e PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), che ha permesso di tracciare il flusso dei ceppi tra i diversi ambienti, individuare eventuali ceppi residenti e definire le aree a maggiore rischio per la contaminazione dei prodotti, e di mettere inoltre in relazione i ceppi riscontrati sui prodotti con quelli isolati dagli ambienti di lavorazione.

MATERIALI E METODI

La ricerca è stata condotta, nel corso di due annualità successive, presso due caseifici ovini industriali situati nel centro Sardegna, uno privato (Caseificio A) e uno di una cooperativa di allevatori ovini (Caseificio B). Entrambi gli stabilimenti, si occupano della trasformazione e commercializzazione di formaggi e ricotte ottenute esclusivamente da latte ovino. In ciascuno stabilimento sono stati effettuati 7 campionamenti ambientali in particolare lungo le linee di produzione del Pecorino Romano dop e della ricotta salata. Nel corso della prima annualità sono stati effettuati nei due stabilimenti 5 campionamenti ambientali, 3 di questi nei periodi in cui avviene la maggiore produzione (gennaio, marzo, giugno), gli altri 2 nel periodo di attività ridotta o assente (settembre e ottobre). Nel corso della seconda annualità sono stati effettuati ancora 2 campionamenti ambientali nei periodi di maggiore produzione (febbraio e maggio). Il caseificio A si occupa della trasformazione e commercializzazione di formaggi e ricotte ottenute esclusivamente da latte ovino raccolto principalmente da allevamenti del centro Sardegna. La produzione aziendale è rappresentata principalmente da Pecorino

Romano, formaggi semicotti e caciotte, ricotte e, occasionalmente, panna e burro di siero per uso industriale. Il latte lavorato è di circa 13.000.000 di litri/anno. Il caseificio B è una cooperativa di allevatori ovini che si occupa della trasformazione industriale del latte prodotto. Il latte viene raccolto quotidianamente in aziende situate nella Sardegna centrale e meridionale. Il caseificio produce diversi formaggi a pasta molle, semi stagionata e a lunga maturazione, come il Pecorino Romano Dop, che costituisce la produzione principale (2.214 tonnellate). Oltre a questi prodotti l'azienda realizza anche un'ampia gamma di prodotti derivati come ricotta, ricotta salata (23.750 Kg), formaggi fusi e da grattugia.

Campionamento

Il campionamento è stato eseguito durante il ciclo produttivo o al termine dello stesso in quanto maggiormente rappresentativo del contesto microbiologico ambientale durante il processo. I campioni ambientali sono stati prelevati nelle aree di caseificazione, di affioramento della ricotta, formatura e salatura, lavaggio, stagionatura e confezionamento, prendendo in considerazione sia le superfici a diretto

contatto con i prodotti alimentari (tavoli, ripiani, carrelli, stampi, macchinari) sia le superfici non a contatto (canalette di drenaggio, pavimenti, pareti) (Figura 4 e 5). Sono stati inoltre effettuati dei tamponi da un pool di 5 forme sulla crosta del Pecorino Romano in fase di stagionatura. Il campionamento dalle superfici è stato effettuato con l'impiego di un kit commerciale monouso (3M, St. Paul, Minnesota, U.S.A.) contenente ciascuno una sponge sterile preinumidita con 10 ml di neutralizing buffer (per neutralizzare eventuali residui di sanificante e per fungere da terreno di trasporto), guanti sterili in materiale plastico e sacchetto sterile per il trasporto della sponge. La modalità di campionamento consisteva nello strofinare le sponge sulle superfici da esaminare, includendo anche punti critici quali fessure e angoli, che successivamente venivano poste in sacchetti sterili per poi essere trasportate a temperatura controllata (4-6°C) presso i laboratori della sezione e analizzate immediatamente. Nel corso del 1°, 2°, 3°, 6° e 7° campionamento, durante i periodi di maggior produzione sono state inoltre prelevate 3 forme di ricotta salata e sottoposte ad analisi per la ricerca di *L. monocytogenes*, sia dalla superficie che dalla pasta.

Complessivamente nel **caseificio A**, durante i sette campionamenti, , sono state esaminate:

- n. 280 superfici ambientali { n. 173 non a contatto con il prodotto
n. 107 a contatto con il prodotto
- n. 27 superfici di Pecorino Romano (1 campione era costituito da un pool di 5 forme)
- n.17 forme di ricotte salate

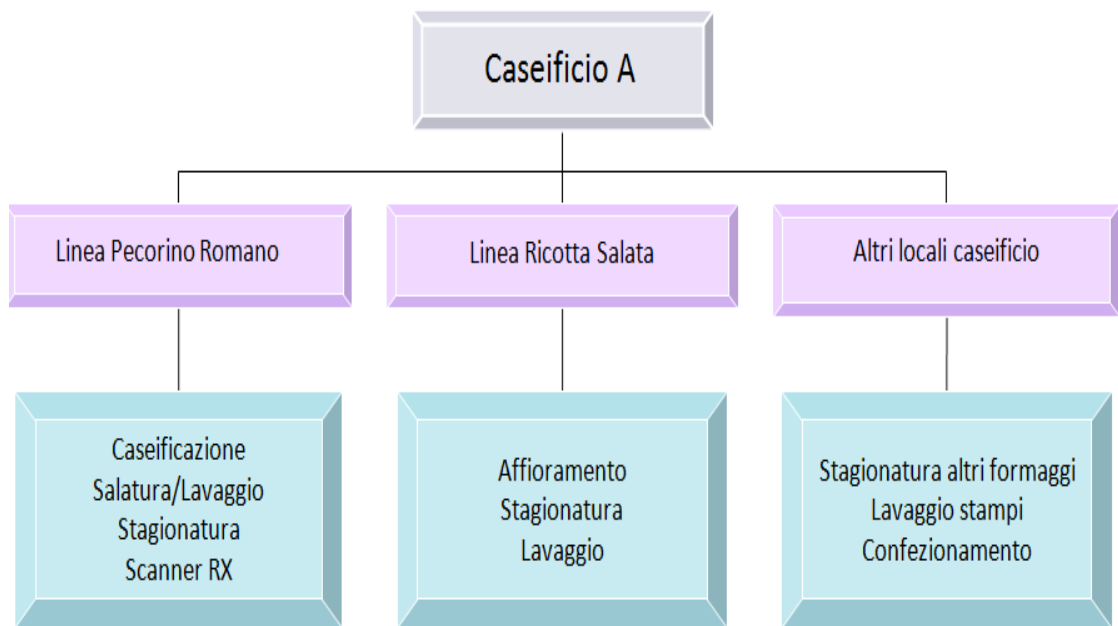


Figura 4. Aree sottoposte a campionamento nel caseificio A

Complessivamente nel **caseificio B**, durante i sette campionamenti, , sono state esaminate:

- n. 290 superfici ambientali
 - n. 169 non a contatto con il prodotto
 - n. 121 a contatto con il prodotto
- n. 20 superfici di Pecorino Romano (1 campione è costituito da un pool di 5 forme)
- n. 15 forme di ricotte salate

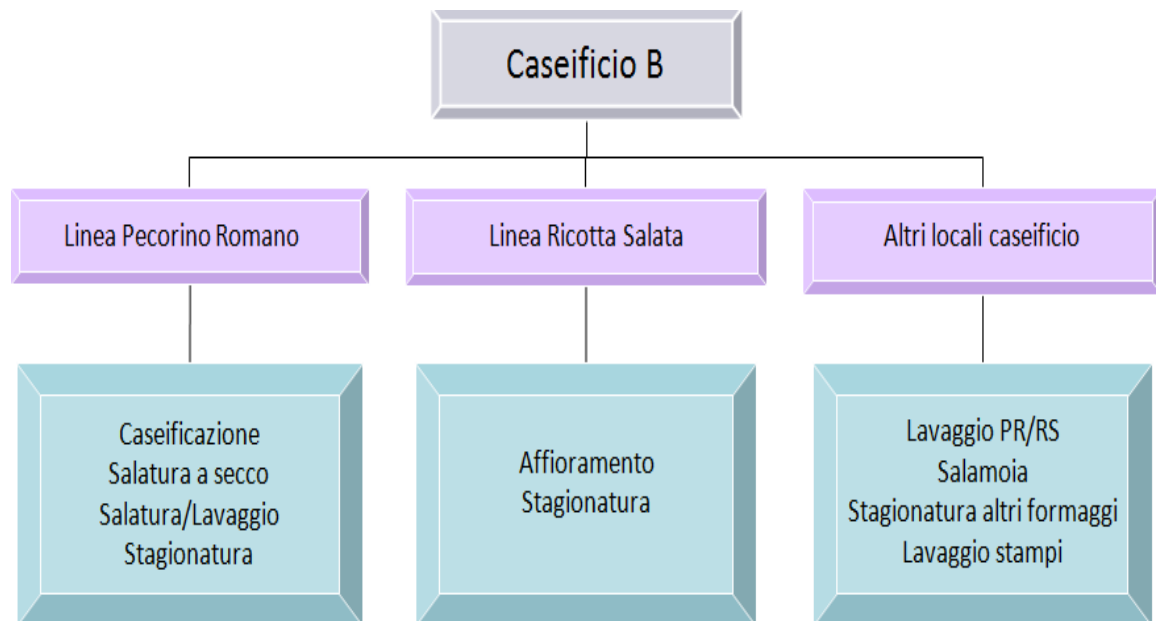


Figura 5. Aree sottoposte a campionamento nel caseificio B

In totale, tra i due caseifici, sono stati prelevati n. 570 campioni ambientali, n.47 campioni dalla superficie del Pecorino Romano e n.32 forme di Ricotta salata e stagionata.

Analisi microbiologiche

Per entrambe le tipologie di campioni (ambientali e matrici alimentari) la determinazione della presenza di *L. monocytogenes* è stata effettuata mediante metodica qualitativa in accordo con la normativa UNI EN ISO 11290:2005-1. Tale metodica è applicabile indifferentemente alle matrici alimentari quanto ai tamponi ambientali.

Per la ricerca di *L. monocytogenes* e di altre specie di *Listeria* i campioni costituiti da una singola sponge per ogni matrice (superficie) sono stati trasferiti in maniera sterile all'interno di una busta stomacker con filtro e addizionati con 90 ml del brodo selettivo di arricchimento primario, Half-Fraser Broth (Biolife), contenete metà della concentrazione di acido nalidixico e acriflavina. Successivamente si è proceduto ad omogeneizzare per 3 minuti il campione mediante omogeneizzatore peristaltico Stomacker, e ad incubarlo a $+30^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ per 24h.

Per quanto riguarda invece la ricotta salata (forma intera), da ciascun campione si sono ottenute sterilmente due aliquote di 25 gr ciascuna dalla superficie e dal centro

del prodotto. Lo strato superficiale asportato era di circa 1-1,5 mm di spessore. Per il prelievo dell'interno il protocollo di preparazione prevedeva: l'incisione della forma in corrispondenza dello scalzo (spessore 1 cm) e del piatto in corrispondenza della linea mediana. La forma veniva quindi spezzata manualmente. Il campione da 25gr è stato quindi prelevato mediante l'utilizzo di carotatore sterile. Le due aliquote, pesate con le cure dell'asepsi direttamente all'interno di buste stomacker sterili con filtro, venivano addizionate con 225 ml del brodo selettivo di arricchimento primario, Half-Fraser Broth (Biolife) omogeneizzate per 3 minuti il campione mediante omogeneizzatore peristaltico Stomacker, e ad incubarlo a $+30^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ per 24h.

Dopo l'incubazione, si è proceduto al prelievo di un'aliquota di 0,1 ml di sospensione dal brodo in pre-arricchimento, e inoculata in provette contenenti 10 ml di brodo di arricchimento, Fraser Broth (Biolife), mentre, in parallelo, 10 μl sono stati seminati su una piastra di terreno selettivo agarizzato ALOA (Agar Listeria Ottaviani & Agosti, Biolife) e altri 10 μl su una piastra di un'altro terreno selettivo agarizzato, l'OXFORD (OXOID). I brodi di arricchimento e le piastre sono state incubate ad una temperatura

di $+37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ per 48h. Successivamente si è proceduto alla lettura delle piastre, mentre dai brodi di arricchimento si procedeva ad un'ulteriore semina di 10 μl su OXFORD e 10 μl su ALOA e conseguente incubazione ad una temperatura di $+37^{\circ}\text{C}$ per 48 ore. La selettività dell'OXFORD è dovuta alla cicloeximide che inibisce la crescita dei funghi ed alla fosfomicina e cefotetan che inibiscono la flora batterica contaminante. La presenza di esculina e ferro ammonio citrato permettono una presuntiva identificazione delle colonie nere. Infatti le specie di *Listeria* idrolizzano l'esculina a glucosio ed esculetina che reagisce con gli ioni ferro presenti nel terreno. Le colonie di *Listeria* spp risultano perciò tondeggianti, ombelicate di colore scuro/nero e circondate da un alone dello stesso colore.

L'ALOA è un terreno di isolamento cromogenico che consente lo sviluppo delle specie *Listeria* con formazione di colonie blu-verdi. La successiva differenziazione fra le specie è ottenuta con la prova del fosfatidilinositolo o lecitina⁷⁻⁹; con loro idrolisi enzimatica prodotta dalla fosfolipasi di *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* e formazione di alone opaco attorno alla colonia; nessun'altra specie *Listeria* produce un alone. Le colonie con

caratteristiche tipiche venivano isolate in numero di 3 a 5 da ciascuna piastra di ALOA e OXFORD con semina a colonie staccate su terreno non selettivo TSYEA (Tryptic Soy Yeast Extract Agar, Biolife) ed incubate a $+37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore. Le colonie, del diametro di 1-2 mm, si presentavano convesse, incolori, traslucide e a bordi regolari. I ceppi così isolati venivano sottoposti ai successivi test di identificazione.

Test fenotipici

Reazione della catalasi

La catalasi è un enzima utilizzato in batteriologia sistematica per l'identificazione dei batteri. Il principio si basa sulla capacità di tale enzima di liberare ossigeno in seguito alla reazione con il perossido d'idrogeno. Si tratta di porre la colonia batterica da studiare a contatto con l'acqua ossigenata. Dopo aver prelevato una colonia isolata in TSYEA, questa è stata emulsionata su un vetrino con una goccia di soluzione al 3% di perossido di idrogeno. La formazione di bolle di ossigeno indicavano una reazione positiva al test. Il genere *Listeria* è catalasi positivo.

Reazione dell'ossidasi

Per il test dell'ossidasi si utilizzano dischi o strisce di carta sterile imbibiti di Diidroclore di Tetrametil-*p*-fenilendiamina, viene usato per identificare i microrganismi che possiedono l'enzima citocromo ossidasi che, in presenza di ossigeno, ossidano il substrato di Diidroclore di Tetrametil-*p*-fenilendiamina, incolore nello stato ridotto, con formazione di indofenolo di colore blu-violetto. Per la prova è stato utilizzato un kit commerciale (Rosko.dk) costituito da dischi di carta imbibiti di reattivo sulle quali viene distribuita con un'ansa una colonia isolata su TSYEA. La positività al test è data un viraggio del colore della compressa dal bianco al violetto. Il genere *Listeria* è ossidasi negativo.

Colorazione di Gram

Da una colonia isolata in TSYEA, veniva allestito un vetrino successivamente colorato secondo la metodica di Gram: colorazione di cristalvioletto per 2-3 minuti seguita da lavaggio, poi veniva fissato il colorante con una soluzione di iodio e ioduro di potassio

in acqua (liquido di Lugol) per 1 minuto; quindi si trattava con un decolorante (alcol etilico o acetone) e infine con un secondo colorante (fuxina, safranina) rosso. La differenza nella capacità di trattenere il colorante è legata alla presenza di peptidoglicano contenuto nella parete cellulare dei batteri *Gram positivi*. Alla successiva osservazione al microscopio ottico tutte le specie di *Listeria* si presentavano sotto forma di bacilli Gram positivi.

Conservazione dei ceppi batterici

I cloni batterici isolati sono stati distribuiti in criovials in aliquote da 1 ml in una soluzione di brodo BHI (Brain Heart Infusion) con glicerolo al 15% sospensione sono state, e conservati in doppio a -20°C e a -80°C, fino all'utilizzo per le successive analisi biomolecolari e genetiche.

Caratterizzazione biomolecolare di *Listeria monocytogenes*

Per l'identificazione di *L. monocytogenes* è stata allestita una simplex PCR specie-specifica.

Estrazione del DNA

Dopo lo scongelamento, ciascun ceppo batterico è stato seminato in terreno non selettivo BHIA (Brian Heart Infusion Agar, Biogenetics) e lasciato a incubare a +37°C per 18/24 ore. Da ciascuna piastra è stata prelevata un'ansata della patina batterica messa a risospendere in 200 µl di acqua milliQ sterile. Sulla sospensione batterica è stata così eseguita una bollitura mediante forno a microonde per 7/8 min. a 600 Watt (boiling-prep). In seguito la sospensione è stata sottoposta a centrifugazione a 15.000 g per 15 min. al fine di far depositare i detriti cellulari ottenendo, così, un surnatante limpido contenente il DNA batterico. Il DNA così estratto veniva poi conservato a -20°C o

utilizzato subito per l'amplificazione dopo lettura spettrofotometrica (effettuata al fine di ottenere una concentrazione di utilizzo pari a 50 ng/μl).

Allestimento simplex PCR

Per identificare *L. monocytogenes* è stato amplificato un segmento di c.ca 660 bp, specie specifico, interno al gene "iap" delle *Listeria* spp. codificante per la proteina p60 implicata nel processo di invasione cellulare (Hess, J. et al. 1995)

Per la reazione di amplificazione sono stati impiegati i primers indicati da Bubert et al. (1999):

➤ **Lis1B** forward 5'-TTATACGCGACCGAAGCCAAC-3'

➤ **MonoA** reverse 5'-CAAACGCTAACACAGCTACT-3'

La miscela di reazione, per ciascun tubo di reazione, aveva un volume finale di 25 μl ed era costituita da una concentrazione 1,5 μM di ciascun primer, 200 μM di ciascun desossinucleoside trifosfato, 2.5 mM di MgCl₂, tampone 1x Green Go Taq® Flexi buffer Promega, 1U di Go Taq® Hot Start Polymerase Promega e 1 μl di DNA estratto (c.ca 50 ng). Oltre ai tubi di reazione contenenti i DNA dei ceppi di campo, sono stati allestiti

un tubo con un controllo positivo (Ceppo di referenza: *L. monocytogenes* NCTC 10887 ser. 1/2b) e dei tubi contenenti acqua al posto del DNA come controlli negativi. I tubi con i controlli contenevano la stessa mix di reagenti allestita per i campioni. La temperatura e i tempi dei cicli di reazione erano: dopo un'attivazione iniziale della Taq Hot Start a 94°C per 5 min., sono stati eseguiti 30 cicli a 95°C per 15 sec., 58°C per 30 sec. e 72°C per 45 sec. seguiti da un'estensione finale a 72°C per 7 min.

Elettroforesi dei prodotti di PCR

Com'è noto, l'elettroforesi permette di separare molecole di DNA di differente peso molecolare sulla base della loro mobilità in un campo elettrico: essendo il DNA un polianione, la migrazione degli amplificati avviene in direzione dell'anodo con una velocità che, nel gel di agarosio, dipenderà dalle dimensioni dell'amplificato e, in particolare, sarà inversamente proporzionale alla sua dimensione. Il gel di agarosio è stato preparato sciogliendo l'agarosio in polvere (Agarose Electrophoresis grade, Invitrogen) nel tampone TAE 1X (Tris Acetato EDTA) mediante riscaldamento in forno a microonde. Una volta diminuita la temperatura fino a c.ca 55°C, la miscela veniva

versata nell'apposito stampo. Il gel solidificato è stato, quindi, posizionato nella camera elettroforetica (Bio-Rad) contenente, come tampone di corsa, il medesimo tampone TAE 1X. Si è proceduto a caricare da 5 a 8 µl di amplificato in ciascuno dei pozzetti dedicando il primo e l'ultimo dei pozzetti al marker (1 Kb Plus DNA ladder, Invitrogen). L'elettroforesi veniva eseguita a 70-80 Volt per c.ca 30 minuti. Alla fine della corsa il gel è stato immerso in un bagno d'acqua e bromuro di etidio alla concentrazione di 1 µg/ml, sottoposto a lavaggio in acqua per c.ca 20 min. e, successivamente, inserito nel trans-illuminatore a UV (Gel DOC 2000 XR, Bio-Rad). La visualizzazione degli amplificati, l'elaborazione delle immagini e la loro archiviazione è stata effettuata mediante il software Quantity One (BioRad).

Definizione della persistenza ambientale di Listeria monocytogenes

Nelle aree dei due caseifici risultate maggiormente contaminate da *L. monocytogenes* è stato condotto uno studio di popolazione del patogeno mediante sierotipizzazione e PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis); a tal fine, sono stati presi in considerazione n. 70 ceppi di *L. monocytogenes*, isolati nel corso di due campionamenti successivi, effettuati nel periodo di maggiore produzione e a distanza di tre mesi l'uno dall'altro. Dei 70 ceppi selezionati, 36 (34 provenienti da matrici ambientali e 2 da matrici alimentari) sono stati isolati nel caseificio A e 34 (32 provenienti da matrici ambientali e 2 da matrici alimentari) isolati dal caseificio B.

Sierotipizzazione

Tra tutti i campioni identificati con prc-simplex, come appartenenti alla specie *L. monocytogenes*, sono stati selezionati 70 ceppi, 36 (34 provenienti da matrici ambientali e 2 da matrici alimentari) isolati dal caseificio A e 34 (32 provenienti da matrici ambientali e 2 da matrici alimentari) isolati dal caseificio B. Di questi ceppi è stato definito il sierotipo di appartenenza mediante multiplex PCR, in accordo con

quanto descritto da Doumith et al. (2004). L'amplificazione è stata svolta utilizzando 5 coppie di primers (Imo0737, Imo1118, ORF2819, ORF2110 e prs) e condizioni di reazione secondo le indicazioni di Doumith (Doumith et al., 2004):

- **Imo 0737** forward 5'-AGGGCTTCAAGGACTTACCC-3'
reverse 5'-ACGATTCTGCTTGCCATTC-3'
- **Imo 1118** forward 5'-AGGGGTCTTAAATCCTGGAA-3'
reverse 5'-CGGCTTGTTCCGGCATACTTA-3'
- **ORF2819** forward 5'-AGCAAAATGCCAAAACCTCGT-3'
reverse 5'-CATCACTAAAGCCTCCCATTG-3'
- **ORF 2110** forward 5'-AGTGGACAATTGATTGGTGAA-3'
reverse 5'-CATCCATCCCTTACTTTGGAC-3'
- **Prs** forward 5'-GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG-3'
reverse 5'-CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG-3'

La miscela finale di reazione (100 µl) ed era costituita da 2U di Taq DNA polimerasi, da 0,2 mM di dNTPs, 50 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂, 2 mM MgCl₂, 1 µM per i primers Imo0737, ORF2819 e ORF2110, 1,5 µM per il primer Imo1118, 0,2 µM per prs, e infine 100 ng di DNA del campione. La temperatura e i tempi dei cicli di reazione erano: denaturazione iniziale a 94°C per 3 min., 35 cicli a 94°C per 0,40 min., 53°C per 1,15 min. e 72°C per 1,15 min., seguiti da un'estensione finale a 72°C per 7 min.

Questa tecnica PCR permette di distinguere, in unico test, il sierotipo dei ceppi di *L. monocytogenes* identificati: 1/2a (3a), 4b e 1/2b(3b) e 1/2c (3c). E' da tenere presente, infatti, che i sierotipi 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b sono quelli più frequentemente isolati dagli alimenti e dai pazienti affetti da listeriosi (Doumith et al., 2004). I prodotti di amplificazione ottenuti sono stati, poi, separati mediante elettroforesi su gel di agarosio, colorati con bromuro di etidio e visualizzati con trans-illuminatore UV Gel DOC XR, Bio-Rad, utilizzando le medesime condizioni usate per separare gli amplificati della pcr-simplex.

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

La Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) è stata condotta secondo il protocollo indicato da Pulsenet Europe (<http://www.pulsenet-europe.org>; Graves L.M. e Swaminathan B., 2001), che prevede una restrizione enzimatica "in situ" del DNA batterico mediante le endonucleasi di restrizione *Ascl* e *Apal*; questo ha permesso di

ottenere due profili di restrizione o “*fingerprinting*” per ciascun ceppo garantendo così una maggiore discriminazione.

Preparazione della sospensione cellulare

Una colonia isolata da coltura pura è stata inoculata in doppio in 5 ml di BHI ed incubata a 37°C o/n in agitazione. Al termine le brodocolture sono state riunite e ne è stata determinata la densità ottica ad una lunghezza d’onda pari a 600 nm. Il pellet è stato risospeso in buffer TE pH 8,0 in quantità variabile tra 1,6 e 1,8 ml per densità ottiche a 600 nm variabili tra 1,4 e 1,6; 240 µl di questa sospensione batterica unitamente a 60 µl di lisozima 10 mg/ml sono stati posti ad incubare a 37°C per 10 minuti.

Preparazione dei plugs

In un ambiente termostato a 50°C ai 300 µl di sospensione batterica lisata con lisozima sono stati aggiunti 270 µl di Agarosio *low melting* (BioRad) al 2% in acqua, unitamente a 30 µl di SDS al 10% (c. f. 1%) e 3 µl di Proteinase K 20 mg/ml (c. f. 0,2 mg/ml). Dopo aver miscelato il tutto accuratamente senza formare bolle sono stati

dispensati circa 100 µl di miscela in ciascun plug del mold (50-Well Disposable Plug Molds, BioRad) sino a completa polimerizzazione a +4°C per almeno 30 minuti.

Estrazione del DNA

Nel processo di estrazione del DNA batterico totale i plugs dopo polimerizzazione sono stati trasferiti in 4 ml di buffer di lisi (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 1% Lauryl sarcosine, 0.15 mg/ml Proteinase K) ed incubati a 50°C per 2 – 3 ore in agitazione. Al termine eliminato il buffer di lisi i plugs sono stati lavati per 2 volte con 15 ml di acqua deionizzata riscaldata a 50°C per 10 minuti ciascuna, ed in seguito per 4 volte con TE pH 8,0 sempre a 50°C per 15 minuti ciascuna.

Restrizione enzimatica

Per ciascun ceppo batterico sono state eseguite due digestioni enzimatiche diverse con due diversi enzimi di restrizione: *Asc I* e *Apa I*, in un volume finale di 500 µl per *Asc I* e 250 µl per *Apa I*.

➤ **Digestione con *Asc I*:** Un plug, 50 µl buffer 10 X NE4, 50 µl BSA acetilata

10mg/ml, 5 µl *Asc I* (10 ui/µl), acqua q.b..Incubare a 37°C per 5 ore;

➤ **Digestione con Apa I:** Un plug, 25 µl buffer 10 X NE4, 25 µl BSA acetilata

10mg/ml, 4 µl *ApaI* (50 ui/µl), acqua q.b..Incubare a 30°C per 5 ore;

Dopo la restrizione enzimatica i plugs sono stati lavati con 5 ml di TE pH 8,0 per 30 minuti, quindi se non sottoposti a corsa elettroforetica immediata conservati a + 4°C.

Corsa elettroforetica

I frammenti di plugs venivano sottoposti ad elettroforesi in campo pulsato (PFGE) mediante apparecchio CHEF Mapper® della BioRad, i parametri di corsa sono stati i seguenti: Volt 6/cm, Angolo120°, Ramping Lineare, Switch 4 sec. – 40 sec., Temperatura 14°C, Durata 22 ore.

Colorazione

Il gel dopo la corsa elettroforetica è stato colorato per 1 minuto in una soluzione in TBE 1X di bromuro d'etidio e decolorato in acqua MilliQ per circa 1 ora.

Analisi dei profili

I profili sono stati visualizzati I transilluminatore ed acquisiti mediante Gel DOC XR (Bio-

Rad) e il software associato Quantity One (Bio-Rad). L'analisi dei profili di restrizione visualizzati in un dendrogramma, è stata effettuata mediante software GelCompar II v.6.0 (Applied Maths, Belgio), sono stati raggruppati in clusters adottando l'algoritmo *Unweighted Pair Group Method using Averages* (UPGMA) e il coefficiente di correlazione di Dice con una tolleranza del 1,5%.(ottimizzazione massima di 1,5%; tolleranza massima 1,5%). Due profili sono considerati differenti se differiscono per almeno una banda.

Analisi dei dati

Il confronto dei dati di prevalenza di *L. monocytogenes* nei due caseifici in relazione alle superfici (contatto, non a contatto e prodotto) è stata effettuata mediante il Fisher's Exact Test. La probabilità di riscontrare *L. monocytogenes* è stata investigata mediante regressione logistica secondo il modello: $\log \left[\frac{\pi_i}{(1-\pi_i)} \right] = \beta_0 + \beta_1 C_k + \beta_2 D_t + \beta_3 M_f + \beta_4 S_l + e_{k t f l}$, dove: $\log \left[\frac{\pi_i}{(1-\pi_i)} \right]$ è la probabilità di osservare campioni positivi per *Lm*, β_0 è l'intercetta, $\beta_1 C_k$ è l'effetto del caseificio, $\beta_2 D_t$ l'effetto della data, $\beta_3 M_f$ l'effetto dell'area, $\beta_4 S_l$ l'effetto della superficie ed $e_{k t f l}$ l'effetto

residuo. L'elaborazione statistica dei risultati è stata condotta mediante software

Statgraphics Plus vers.16.0.09 (Centurion).

RISULTATI

I risultati riguardanti le positività e le prevalenze sono illustrati nelle tabelle 3, 4, 5, 6.

Nelle tabelle 7 e 8 sono espresse le prevalenze i sierotipi e i cluster, rispettivamente per il caseificio A e B. Nella figura 6 è illustrata la multiplex pcr utilizzata per la sierotipizzazione. Infine nella figura 7 è illustrato il dendrogramma dei pusotipi.

Prevalenza complessiva

Nel corso dei 7 campionamenti eseguiti presso ciascuno dei due caseifici sono stati prelevati un totale di 570 campioni ambientali di cui 280 nel caseificio A e 290 nel caseificio B. La prevalenza complessiva di campioni positivi per la presenza di *Listeria monocytogenes* è stata del 17,71%.

Nel caseificio A 65 campioni sono risultati positivi, con una prevalenza media del 23,21% (tabella 3). Nel Caseificio B sono stati riscontrati 36 campioni positivi, con una prevalenza media del 12,41%. Nel corso dei 7 campionamenti eseguiti nei due caseifici su un totale di 101 campioni riscontrati positivi 42 (41,58 %) sono stati prelevati da

superfici a contatto con il prodotto, mentre 59 (58,41%) da superfici non a contatto con il prodotto. La prevalenza di *L.monocytogenes* nei due caseifici per tipologia di superficie e data di campionamento è illustrata nella tabella 1.

Durante i primi tre campionamenti (gennaio, marzo e giugno) e gli ultimi due (febbraio e maggio) le contaminazioni hanno riguardato, in entrambi gli stabilimenti la linea di produzione del Pecorino Romano sia sulle superfici non a contatto che a contatto (di queste ultime in particolar modo la macchina lava-formaggi e la macchina di salatura) e la linea di produzione della ricotta solo sulle superfici non a contatto (pavimenti e canalette di drenaggio). Nei due campionamenti di settembre e ottobre le contaminazioni hanno invece riguardato esclusivamente la linea del Pecorino Romano (sia superfici a contatto che non a contatto).

Prevalenze nel Caseificio A

Tipologia di superficie

Nel caseificio A dei 65 siti contaminati 29 hanno riguardato le superfici a contatto e 36 le superfici non a contatto. La prevalenza è stata maggiore per le superfici a contatto

(27%) rispetto a quelle non a contatto (20,8%) (tabella 3). Per quanto riguarda le superfici a contatto, le aree del caseificio prevalentemente interessate erano quella di lavaggio del Pecorino Romano in cui è stata riscontrata la presenza di *L.monocytogenes* in 18 siti (62%) e quella di stagionatura del Pecorino Romano con 8 siti positivi (27,5%). Per quanto riguarda invece le superfici non a contatto la contaminazione riguardava principalmente le canalette di drenaggio, risultate positive in 19 casi (53%) e i pavimenti con 15 casi (41,5%), mentre le pareti con 2 casi positivi hanno avuto una prevalenza di contaminazione pari al 5,5%.

Aree dello stabilimento

Le aree interessate erano prevalentemente quella di lavaggio dei prodotti con 11 positività (30,6%), di stagionatura del Pecorino Romano in cui *L.monocytogenes* è stata ritrovata in 10 occasioni (27,7%) e l'area di lavorazione della ricotta con 9 positività (25%).

Prevalenze nel Caseificio B

Tipologia di superficie

Nel caseificio B dei 36 siti contaminati 13 hanno riguardato le superfici a contatto e 23 le superfici non a contatto. Al contrario del caseificio A, la prevalenza è stata maggiore per le superfici non a contatto (13,6%) rispetto a quelle a contatto (10,7%) (tabella 3).

Per quanto riguarda le superfici a contatto, le aree del caseificio prevalentemente interessate erano quella di lavaggio del Pecorino Romano/Ricotta salata, mentre le restanti positività sono state riscontrate nell'area confezionamento, ed in particolare sulla superficie della macchina porzionatrice. Per quanto riguarda invece le superfici non a contatto la contaminazione è risultata maggiore sui pavimenti di diverse aree del caseificio e nelle canalette di drenaggio.

Aree dello stabilimento

In generale le aree maggiormente contaminate da *L. monocytogenes* erano quella di lavaggio del Pecorino Romano/ Ricotta salata con 6 positività (22%), di stagionatura del Pecorino Romano in cui *L. monocytogenes* è stata ritrovata in 5 occasioni (18%), ed infine la cella di stagionatura di altre tipologie di formaggi e l'area della salamoia, in entrambi i casi con 4 positività (15%).

Prevalenza nei prodotti

La prevalenza di *L. monocytogenes* nei due caseifici per tipologia di prodotto e data di campionamento è illustrata nella tabella.

- Nel caseificio A su 27 tamponi effettuati a partire dalla superficie del Pecorino Romano, è stata rilevata contaminazione da *L. monocytogenes* in 7 casi (25,9%) (tabella 3). I campioni contaminati provenivano da 5 differenti celle di stagionatura dei formaggi. Per quanto riguarda la ricotta salata, su 17 forme prelevate nel corso di 7 campionamenti non è stata mai rilevata la presenza di *L. monocytogenes*, nè sulla superficie nè all'interno della pasta.

- Nel caseificio B su 21 tamponi effettuati a partire dalla superficie del Pecorino Romano, è stata rilevata contaminazione da *L. monocytogenes* in 2 casi (9,5%) (tabella 3). I campioni contaminati provenivano da 2 differenti celle di stagionatura dei formaggi. Su un totale di 15 forme di ricotta salata prelevate nel corso di 7 campionamenti non è stata mai rilevata la presenza di *L. monocytogenes*, nè sulla superficie nè all'interno della pasta.

Analisi molecolare e studio di popolazione

Lo studio di popolazione ha riguardato 70 ceppi . La prevalenza, il sierotipo ed il cluster di appartenenza dei ceppi isolati per ciascun caseificio è riportata in tabella. I 36 ceppi isolati nel caseificio A appartenevano ai sierotipi 1/2a, 1/2b e 4b, rappresentati ciascuno da 12 ceppi (33,3%), mentre i 34 ceppi isolati nel caseificio B appartenevano tutti al sierotipo 1/2a. Lo studio di popolazione ha consentito di includere gli isolati in 8 cluster (CL I, CL II, CL III, CL IV, CL V, CL VI, CL VII, CL VIII), (Tabella 2). Nel caseificio A sono stati riscontrati ceppi appartenenti ai CL I (n=11), II (n=9), III (n=2), IV (n=1) e VIII (n=13). I ceppi appartenenti al CL II (n=7) sono stati isolati in diverse aree situate lungo la linea di produzione del PR (contaminazione verticale), fino alla superficie del prodotto (n=2). Il CL VIII era rappresentato da ceppi (n=13) isolati lungo la linea della ricotta salata da aree differenti, ma esclusivamente da superfici non a contatto. Nel caseificio B sono stati isolati ceppi dei CL II (n=2), V (n=26), VI (n=4), VII (n=1) e VIII (n=1). In questo caseificio il CL V è stato quello maggiormente rappresentato (26 ceppi su 34) e veniva rilevato nelle aree di salamoia e di lavaggio che, in questo caseificio,

erano comuni per PR e ricotta salata. Ai CL VIII e II, comuni ai due caseifici, appartenevano rispettivamente 13 e 9 ceppi nel caseificio A, 1 e 2 ceppi nel caseificio B. In ciascuno dei due caseifici, nelle aree di lavaggio si osserva la maggiore variabilità dei ceppi, con isolati rappresentativi di tutti i cluster isolati.

Discussione

I risultati della presente ricerca, eseguita presso due caseifici ovinu industriali della Sardegna, hanno confermato la notevole diffusione e il frequente isolamento di *Listeria monocytogenes* negli ambienti di produzione degli stabilimenti caseari a carattere industriale.

Tra i due caseifici sono state evidenziate differenze significative nella prevalenza (23,16% vs 13,11%) della contaminazione ambientale da *Listeria monocytogenes*, nel complesso il caseificio A ha mostrato una probabilità di contaminazione doppia rispetto al caseificio B. Anche la prevalenza complessiva di contaminazione da *L. monocytogenes* sul Pecorino Romano è stata maggiore (15,9% vs 5,5%) nel caseificio A rispetto al caseificio B. È da mettere in rilievo come tali differenze siano da imputarsi principalmente a differenze riscontrate lungo linea di produzione del Pecorino Romano. Il mancato isolamento di *L. monocytogenes* a partire dall'area di caseificazione e le basse prevalenze osservate nelle aree di affioramento della ricotta confermano come, anche nei caseifici ovinu industriali, la contaminazione dei prodotti

sia prevalentemente post-processo (De Buyser et al., 2001; Kells & Gilmour, 2004). Il riscontro di prevalenze più elevate nei locali di salatura/salamoia, lavaggio, stagionatura e confezionamento evidenzia come le manipolazioni ed il contatto mediato o diretto nelle fasi post-processo, costituiscano la principale via di contaminazione dei prodotti. La spiccata capacità che *L. monocytogenes* ha di sviluppare alle basse temperature e la tolleranza ad una elevata pressione osmotica, giustificano ampiamente la colonizzazione dei suddetti ambienti da parte del microrganismo.

Lo studio di popolazione, ha permesso di tracciare il flusso dei ceppi tra i diversi ambienti, individuare eventuali persistenze nello stabilimento, nonché gli eventuali cicli di contaminazione-ricontaminazione delle aree. Il riscontro di ceppi appartenenti ad un numero limitato di cluster nell'area di stagionatura e nei prodotti evidenzia che in tali ambienti si verifica la selezione e persistenza di ceppi residenti. Nel caseificio A, i ceppi isolati sulla superficie del Pecorino Romano appartengono al cluster prevalente (CL II) lungo la linea di produzione/stagionatura e ciò indica una diffusione verticale

degli stessi. Nel caseificio B, invece, i ceppi isolati dal Pecorino Romano appartenevano al cluster maggiormente diffuso nello stabilimento il CL V, e prevalente nell'area di lavaggio di formaggi e ricotte. Questo sito rappresenta il locale dove si incrociano i flussi del prodotto in ingresso ed in uscita dai locali di stagionatura, talvolta anche di prodotti che provengono da altri stabilimenti. Costituisce pertanto un importante sito di diffusione orizzontale dei ceppi nei diversi ambienti del caseificio.

Sulla base di quanto sopra evidenziato è ragionevole presupporre che anche all'interno dei caseifici interessati da questa indagine siano presenti ceppi residenti di *L. monocytogenes* che possono essere trasferiti con modalità diverse ai prodotti analogamente a quanto riportato in bibliografia sull'esistenza di ceppi residenti o persistenti negli stabilimenti di trasformazione anche per svariati anni.

Inoltre, l'isolamento nei due caseifici di ceppi di *L.monocytogenes* appartenenti prevalentemente ai sierotipi 1/2a, 1/2b e 4b è di grande interesse sanitario, in quanto nella maggior parte dei casi (> 90%) sono stati frequentemente associati ad infezioni umane (Rocourt e Billè, 1997; Thèvenot et al., 2005).

La diffusione della contaminazione ambientale da *L. monocytogenes* determina quindi, inevitabilmente, contaminazioni del prodotto difficili da controllare o mitigare. I due prodotti presi in considerazione in questa ricerca, hanno inoltre delle caratteristiche peculiari che li rendono vulnerabili nei confronti di questo patogeno: la Ricotta Salata è un prodotto permissivo alla crescita di *L. monocytogenes* (pH 5.6-6.0; a_w 0,30-0,980), prevede uno stoccaggio prolungato e spesso viene porzionata per la vendita; il Pecorino Romano, invece, pur essendo un prodotto che non supporta la crescita di *L.monocytogenes* (pH 5.8; a_w 0,86) ha una crosta edibile che viene sottoposta ad un'elevata esposizione durante la maturazione.

Conclusioni

In conclusione l'indagine ha permesso di evidenziare una marcata contaminazione da parte di *Listeria monocytogenes* che, con frequenze variabili, ha interessato le zone dei caseifici deputate alla salagione e stoccaggio, testimoniando la presenza di presupposti per la contaminazione del prodotto finito.

Listeria monocytogenes per la sua diffusione negli ambienti di lavorazione dei caseifici ovini richiede l'adozione di strategie e misure di controllo. La legislazione europea (Reg. CE 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari) prescrive principi di sicurezza per definire l'accettabilità di un prodotto alimentare e dei relativi processi di lavorazione, manipolazione e distribuzione. Gli operatori del settore alimentare (OSA) sono tenuti a rispettare tali limiti e ad accertarne il rispetto attraverso il prelievo di campioni ed analisi. Tali controlli non riguardano solamente il prodotto finito, ma anche le materie prime, l'igiene di processo, il controllo delle temperature e studi sulla conservabilità dei prodotti per stabilirne la shelf-life. Rappresentando *Listeria monocytogenes* un possibile rischio per la salute pubblica vi è

la necessità di eseguire la ricerca di tale microrganismo mediante il prelievo di campioni sul luogo di produzione e lavorazione dell'industria alimentare, nonché dalle attrezzature. La rilevazione della presenza ambientale del microrganismo (monitoraggio), rappresenta un'utile misura per la prevenzione delle contaminazioni del prodotto. La riduzione della contaminazione ambientale rappresenta un obiettivo fondamentale degli interventi di controllo attraverso interventi sui prerequisiti igienici. Rispetto alle caratteristiche rilevate negli stabilimenti in cui sono state condotte le attività di ricerca, rappresentativi dei caseifici ovis caprini regionali, è necessario intervenire sui requisiti strutturali, sul lay-out e sui flussi associati. E' necessario realizzare interventi finalizzati principalmente a ridurre le nicchie e le condizioni ambientali spesso favorevoli alla persistenza e diffusione delle contaminazioni da *Listeria monocytogenes*. Nell'ambito del programma dei prerequisiti gli interventi di miglioramento del controllo dell'igiene ambientale investe in particolare alcune procedure, quali la formazione degli operatori, la pulizia e sanificazione e i programmi di monitoraggio, la definizione della conservabilità. Nei caseifici che trasformano latte

di pecora tuttavia sono realizzati prodotti permissivi in grado di supportare lo sviluppo di *Listeria monocytogenes*, in particolare formaggi freschi e ricotte. E' inoltre possibile la contaminazione dei formaggi stagionati, anche se soltanto in superficie, in particolare del Pecorino Romano. Per i prodotti permissivi, pur considerando le esigenze di definire una shelf-life adeguata alle esigenze commerciali, è necessario adottare specifiche misure di controllo. In particolare per la ricotta salata è richiesta una conservazione prolungata e una soluzione appare l'adozione di un trattamento listericida post-letale mediante trattamento termico, già praticato da alcune aziende. Le ulteriori prospettive della ricerca sono rappresentate dalla ottimizzazione delle tecniche di trattamento termico o l'individuazione di soluzioni innovative. Tra le soluzioni da valutare appaiono praticabili le tecniche di decontaminazione quali le alte pressioni oppure di misure atte a prevenire o inibire lo sviluppo di questo microrganismo, quali l'impiego di conservanti antimicrobici, batteriocine, colture bioprotettive o fagi.

TABELLE

Tabella 3. Prevalenze complessive nei due caseifici

Superfici	Caseificio A		Caseificio B	
	n	positivi	n	positivi
contatto	107	29 (27,1%)	121	13 (10,7%)
non a contatto	173	36 (20,8%)	169	23 (13,6%)
Totale	280	65 (23%)	290	36 (12,4%)
Pecorino Romano	27	7(25,9%)	21	2 (9,5%)
Ricotta Salata	17	0 (0%)	15	0 (0%)
Totale	44	7 (15,9%)	36	2 (5,5%)

Tabella 4. Prevalenza di *Lm* in due caseifici ovisi industriali, per tipologia di superficie.

Superfici	Caseificio A		Caseificio B		<i>P</i> *
	n	positivi	n	positivi	
contatto	31	8 (25,8%)	18	4 (22,2%)	>0,05
non a contatto	52	13 (25,0%)	31	13 (41,9%)	>0,05
prodotto	14	1(7,1%)	11	1(9,1%)	>0,05

* $P > 0,05$: indica differenze non significative della prevalenza di *Lm* tra i due caseifici

Tabella 5. Prevalenza di *Lm* nei caseifici A e B nel corso dei 7 campionamenti per tipologia di superficie

Periodo	1° ANNO										2° ANNO			
	1°		2°		3°		4°		5°		6°	7°		
	GENNAIO		MARZO		GIUGNO		SETTEMBRE		OTTOBRE		FEBBRAIO	MAGGIO		
<i>Superficie</i>	Positivi		Positivi		Positivi		Positivi		Positivi		Positivi		Positivi	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
A A contatto	16	4(25%)	15	5(33,3%)	16	4(25%)	15	5(33,3%)	14	5(35,7%)	16	2(12,5%)	15	4(26,6%)
Non a contatto	24	4(16,7%)	26	5(19,2%)	26	8(30,8%)	23	6(26,1%)	23	5(21,8%)	26	4(15,3%)	25	4(16%)
TOTALE	40	8 (20%)	41	10 (24,3%)	42	12 (28,5%)	38	11 (28,9%)	37	10 (27%)	42	6 (14,2%)	40	8 (20%)
B A contatto	21	2(9,5%)	16	2(12,5%)	2	1(50%)	20	2(10%)	20	2(10%)	22	3(13,6%)	20	1(5%)

Non a contatto	30	2(6,6%)	19	6(31,5%)	12	7(58,3%)	26	3(11,5%)	26	3(11,5%)	31	2(6,4%)	25	0(0%)
TOTALE	51	4 (7,8%)	35	8(22,8%)	14	8 (57%)	46	5(10,8%)	46	5(10,8%)	53	5 (9,4%)	45	1(2,2%)

Tabella 6. Prevalenza di *Lm* nei caseifici A e B nel corso dei 7 campionamenti per tipologia di prodotto

Periodo	1° ANNO										2° ANNO			
	1°		2°		3°		4°		5°		6°		7°	
	GENNAIO		MARZO		GIUGNO		SETTEMBRE		OTTOBRE		FEBBRAIO		MAGGIO	
Prodotto	n	Positivi (%)	n	Positivi (%)	n	Positivi (%)	n	Positivi (%)	n	Positivi (%)	n	Positivi (%)	n	Positivi (%)
A Pecorino Romano	3	2(67%)	3	0(0%)	3	1(33%)	5	3(60%)	3	1 (33%)	5	0(0%)	5	0(0%)
Ricotta Salata	3	0(0%)	3	0(0%)	4	0(0%)	-	-	1	0(0%)	3	0 (0%)	3	0(0%)
B Pecorino Romano	4	0(0%)	3	0(0%)	4	1(25%)	4	1(25%)	1	0(0%)	2	0(0%)	3	0(0%)

Ricotta Salata	3	0(0%)	3	0(0%)	-	-	2	0(0%)	1	0(0%)	3	0(0%)	3	0(0%)
----------------	---	-------	---	-------	---	---	---	-------	---	-------	---	-------	---	-------

Tabella 7. Prevalenza dei ceppi di *Lm* isolati dalle superfici ambientali in relazione al sierotipo e cluster di appartenenza nel caseificio A

Cas	Area (<i>Lm</i> +)	Campioni			<i>Superfici non a contatto</i>	<i>Superfici a contatto</i>	
		<i>Lm</i> +	tot	%	Sierotipo	Cluster	Cluster
A	Lavaggio PR	3	14	21,4	1/2b		I , II , III
		4		28,6	4b	I , VIII	I , IV
	Stagionatura PR	3	29	10,3	1/2b	II	II
		1		3,5	4b		I
	Lavorazione ricotta	3	15	20,0	1/2a	VIII	
	Lavaggio fiscelle	1	7	14,3	1/2a	VIII	
	Lavaggio ricotta	1	5	20,0	4b	I	
	Stagionatura ricotte	1	3	33,3	1/2a	VIII	
	Confezionamento	1	2	50,0	1/2a	VIII	

Tabella 8. Prevalenza dei ceppi di *Lm* isolati dalle superfici ambientali in relazione al sierotipo e cluster di appartenenza nel caseificio B

Cas	Area(<i>Lm</i> +) <i>Lm</i> +	Campioni			Sierotipo	Superfici non a contatto	Superfici a contatto
		tot	%	Cluster			
B	Salamoia	2	2	100	1/2a	II, V	
	Lavaggio PR/ricotta	7	9	77,8	1/2a	II, V, VIII	V, V, VII
	Stagionatura formaggi	3	5	60,0	1/2a	V	
	Stagionatura PR	3	13	23,0	1/2a	V	
	Stagionatura ricotte	2	3	66,7	1/2a	V	

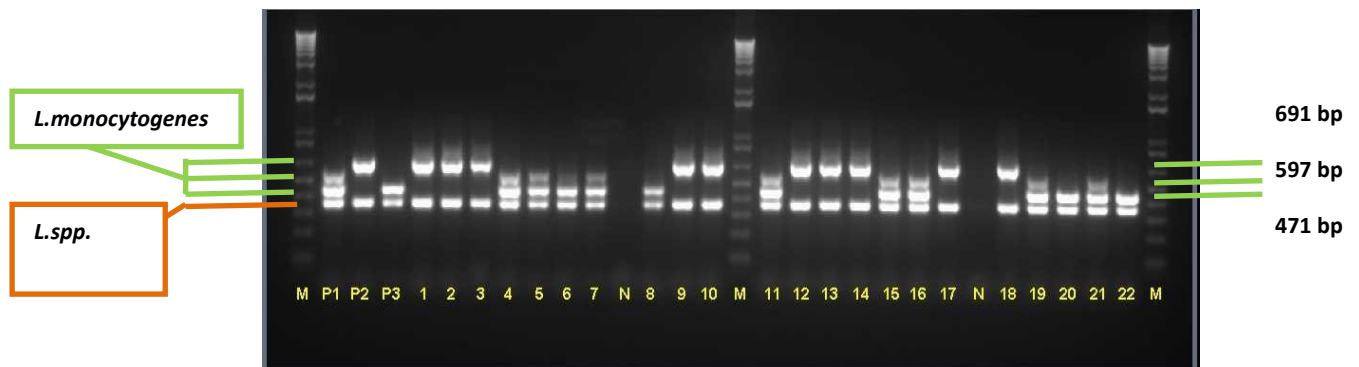


Figura 6. Sierotipi ottenuti con la PCR multiplex: M = 1 Kb PLUS DNA ladder Invitrogen; P1 = controllo positivo ATCC 19115 ser. 4b; P2 = controllo positivo ATCC 19111 ser. ½ a; P3 = controllo positivo NCTC 10887 ser. ½ b; N = controllo negativo

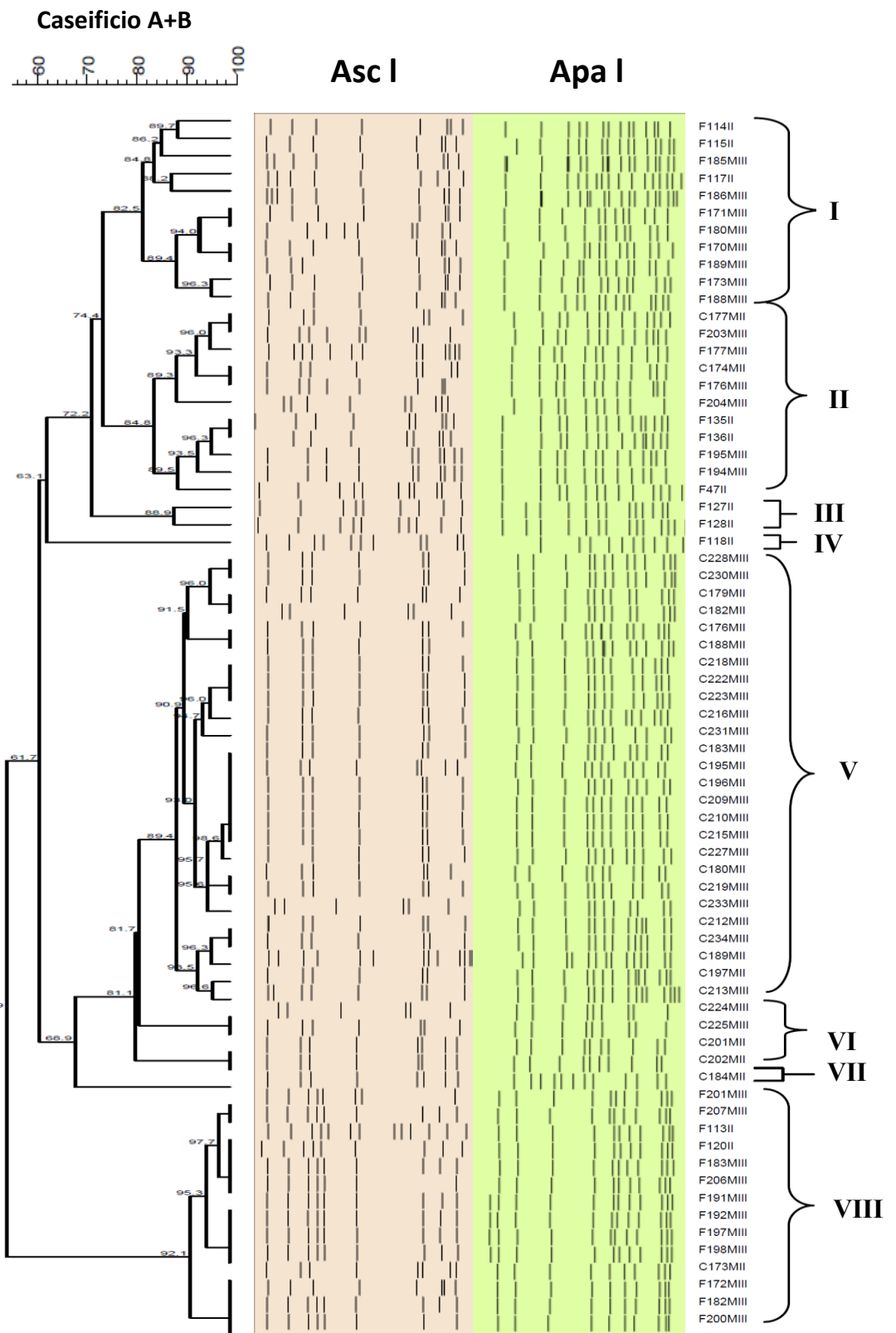


Figura 7. Dendrogramma dei pulsotipi

BIBLIOGRAFIA

- ADASC- Australian Dairy Authorities Standard committee- Australian Manual for control of Listeria in the dairy industry- July 1999
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (Afssa) (2003). Rapport de la Commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes*.
- Arcangeli, G., (2006). Scheda regione Veneto
- Aureli P, Fiorucci GC, Caroli D, Machiaro B, Novaro O, Leone L, Salmoso S (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. N. Engl. J. Med. 342: 1236-1241.
- Aureli, P., 1998. Laboratory findings on *Listeria monocytogenes* strains involved in a large outbreak of febrile gastroenteritis occurred in schools served by a mass-catering system. In: XIII International Symposium on Problems of Listeriosis, Halifax, Abstract No. 47.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition, vol. III (The Firmicutes), 2009;
- Boerlin P, Rocourt J, and Piffaretti JC. 1991. Taxonomy of the genus *Listeria* by using multilocus enzyme electrophoresis. Int. J. Syst. Bacteriol. 41:59-64.
- Boni, P., Vio, P., Pagliuca, G., Trevisani, M., Allegranzi, B., Dalla Ponza, Busani, L., Daminelli, P., Finazzi, G., Ravarotto, L.,(2006). Metodi di tutela sanitaria delle produzioni alimentari di nicchia e di protezione della

popolazione umana dalle pandemie di origine animale. Società italiana di medicina veterinaria preventiva, pp 57-79.

- Bubert, A., I. Hein, M. Rauch, A. Lehner, B. Yoon, W. Goebel, and M. Wagner. 1999. Detection of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4688-4692.
- Bulletin of the International Dairy Federation (IDF), 392/2004
- Carminati, D., Perrone, A., Giraffa, G., Neviani, E., Mucchetti, G., 2004. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Gorgonzola cheese rinds. *Food Microbiology* 21, 801–807.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Imported Frescolina Marte Brand Ricotta Salata Cheese. Posted September 27, 2012 5:15 PM ET, www.cdc.gov/outbreaknet/outbreaks.html
- Charpentier E., Courvalin P., (1999). Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 2103-2108
- Consorzio per la tutela del formaggio “Pecorino Romano” (2012)
- Cotter P.D. Gahan C.G.M., Hill C., A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid, *Molecular microbiology*, 2001, 40, 2, 465-475
- Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B., Proctor, M.E. and Griffin, P.M.(1997) An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *New England Journal of Medicine* 336, 100–105.

- D'Amico, D.J., Donnelly, C.W., 2010. Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: effect of farm characteristics and practices. *J. Dairy Sci.* 93, 134-147.
- David, Jörg Rau, Marcel R. Eugster, Martina C. Haug, Paul A. Lawson, Christophe Lacroix, and Leo Meile (2012) *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese *Int J Syst Evol Microbiol* ijs.0.036947-0 2.
- De Santis E.P.L., Mazzette R., Tedde T., Pilo A.L., Scarano C., Meloni D. (2005). Indagine sulla prevalenza di *L. Monocytogenes* e sui siti di contaminazione in caseifici ovini. *Atti XV Convegno Nazionale Associazione Italiana Veterinari Igienisti, AIVI*, 227-231
- De Vos P., G.M. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.H. Schleifer And W.B. Whitman (Eds): *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, Second Edition, Vol. 3 (The Firmicutes)*, Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 2009, P. 244.
- DECISIONE DELLA COMMISSIONE - del 5 novembre 2010 - concernente una partecipazione finanziaria dell'Unione a un programma coordinato di sorveglianza sulla prevalenza di *Listeria monocytogenes* in taluni alimenti pronti, da realizzare negli Stati membri . Notificata con il numero C(2010) 7516] (2010/678/UE)
- Donnelly G.W., Brackett R.E., Doores S., Lee W.H., Lovett J.,(1992). *Listeria*, in *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, Third Edition, Edited By Vanderzant C. and Splittstoesser D. F., American Public Health Association, 637-663.

- Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jaquet C, Martin P 2004a. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by Multiplex PCR. J Clin Microbiol 42: 3819-3822.
- Durmaz H., Sagun E., (2004). The effects of manufacturing and ripening period of herb cheeses on the growth of *Listeria monocytogenes*. Veteriner Bilimleri Dergisi 20, 87-94
- Dussurget O., Pizzarro-Cerda J., Cossart P., Molecular Determinants of *Listeria monocytogenes* virulence, Annual Review of Microbiology, 2004, 58, 587-610
- EFSA. (2010). The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. EFSA Journal, 8(1), 1496.
- European Food Safety Authority (EFSA), The Community Summary Report of Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2008, EFSA Journal; 2010 8(1):1496 [410 pp.].
- European Food Safety Authority (EFSA), The Community Summary Report of Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2009, EFSA Journal 2011;9(3):2090 [378 pp.].
- Evi Lang Halter, Klaus Neuhaus, Siegfried Scherer (2012) *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca*

of a German fresh water pond Int J Syst Evol Microbiol ijs.0.036830-0; Lang Halter et al., 2012

- Fadda Paolo - “Avanguardisti della modernità: alle origini della trasformazione industriale della società agricola sarda”- Sanderson Craig, 1999 - 364 pagine
- FAO/WHO 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: technical report. Microbiological risk assessment series; no. 5. pp. 1-98.
- Farber, J.M. and Peterkin, P.I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol.Rev. 55(3):476-511;
- FDA, 2012. On September 13, 2012 the FDA placed the exporter of the recalled cheese, Fattorie Chiarappa S.R.L. of Conversano, Italy, on Import Alert. <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/CORENetwork>
- FDA/FSIS, (2003). Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. www.cfsan.fda.gov.
- Frederiksen B., Samuelsson S., (1992). Feto-maternal listeriosis in Denmark 1981-1988. J. Food Safety 12, 303-314
- FSIS/USDA (2002). New York firm recalls imported cured ham for possible *Listeria* contamination. [/www.FSIS.usda.gov/OA/recalls/prelease/pr052-2002.htm](http://www.FSIS.usda.gov/OA/recalls/prelease/pr052-2002.htm).

- Gahan C.G.M.,(2005). Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection, a review, *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1345-1353
- Gandhi M., Chikindas M.L. (2007) "Listeria: a foodborne pathogen that knows how to survive". *Int. J. Food Microbiol.*, 113, 1-15
- Gaya, P., Saralegui, C., Medina, M., Nunez, M., 1996. Occurrence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in raw caprine milk. *J. Dairy Sci.* 79, 1936-1941.
- Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, (2005)
- Giraffa G, (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 251-260
- Global Industry Analysts, Inc. (GIA)
- GOLIS project, 2004. Il formaggio Gorgonzola e il problema *Listeria monocytogenes* (GOLIS). Available in Italian at: http://www.agricoltura.regione.lombardia.it/sito/tmpl_action.asp?DocumentId=1408&SezioneId=2809000000&action=Documento. Accessed 29th September, 2008.
- Graves L. M., Swaminathan B PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 65 (2001). 55–62

- Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE, Orsi RH, Fortes ED, Milillo SR, den Bakker HC, Wiedmann M, Swaminathan B, Sauders BD. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010 Jun;60(Pt 6):1280-8. Epub 2009 Aug 10.
- Griffiths M.W. (2002) “*Listeria*, properties and occurrence” in *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, edited by Caballero B, Trugo LC, Finglas PM. 3562-3581 2nd edition, vol.6. Academic press.
- Gualandi G.,(2004). *Listeria*, Cap.22, in *Trattato di Malattie Infettive Degli Animali*, seconda edizione, a cura di Renato Farina, Franco Scamozza, UTET, 2004, Torino 285-293
- Hamdi, T. M., M. Naiïm, P. Martin, and C. Jacquet. 2007. Identification and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated in raw milk in the region of Algiers (Algeria). *Int. J. Food Microbiol.* 116:190–193.
- <http://www.afssa.fr/>
- <http://www.antropozoosi.it/-malattie/tossinfezioni.php>
- <http://www.epicentro.iss.it/problemi/listeria/listeria.asp>
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, (1996). *Micro-organisms in food 5*. Chapman & Hall, London, UK.
- International Standard - ISO 11290-1, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes – Part 1 : Detection method*, First edition 15-12-1996

- ISMEA per Laore Sardegna- Report Latte e formaggi ovini, Il trimestre 2012, numero 3/12 – settembre 2012
- Istat (2009), Struttura e produzione delle aziende agricole
- Istat (2010a), *Sistema informativo su agricoltura e zootecnia*
- Kalorey DR, Warke SR, Kurkure NV, Rawool DB, Barbuddhe SB (2008). *Listeria species in bovine raw milk: A large survey of Central India. Food Control*, 19(2): 109-112.
- Kozak J., Balmer T., Byrne R. and K. Fisher. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: Incidence in dairy products. *Food Control* Vol . 7. No. 415, pp. 215-221, 1996
- La Placa, (2000). *Listeria monocytogenes*, in *Principi di Microbiologia medica – Ottava Edizione*, Società Editrice Esculapio, Bologna, 2000, pag. 250-252
- Laore, settembre 2011-Le produzioni del comparto ovicaprino in Sardegna, Dati sulle produzioni
- Leclercq A., Clermont D., Bizet C., Grimont P. A. D, Le Flèche-Matéos A., Roche S. M., Buchrieser C., Cadet-Daniel V., Le Monnier A., Lecuit M., Allerberger F.- *Listeria rocourtiae* sp. nov.- *Int J Syst Evol Microbiol* 60 (2010),2210-2214;DOI 10.1099/ijs.0.017376-0.
- Loessner M.J., Golden D.A. (2005) *Modern food microbiology*. Springer, USA
- Lomonaco S., Decastelli L., Nucera D., Gallina S., Bianchi D. M., Civera T., *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: Subtypes, diversity and persistence over time. *International Journal of Food Microbiology* 128 (2009) 516–520

- Lovett, J., Francis, D.W., Hunt, J.M., 1987. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. *J. Food Prot.* 50, 188-192.
- Ludwig (W.), Schleifer (K.H.) Et Whitman (W.B.) : Family Iii. Listeriaceae Fam. Nov. In: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2010, 60, 469-472.
- Manfreda, G., De Cesare, A., Stella, S., Cozzi, M., Cantoni, C., 2005. Occurrence and ribotypes of *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 102, 287–293.
- Mayr R., Fricker M., Maoz A., Sherrers S., (2004). Antisternal activity and biodiversity of cheese surface cultures: influence of the ripening temperature regime. *European food research and technology* 218, 242-247
- Mead, P. S., Slutsker, V., Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infect. Dis.* 5:607–625.
- Meyer-Broseta, S., Diot, A., Bastian, S., Riviere, J., Cerf, O., 2003. Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw-milk. *International Journal of Food Microbiology* 80, 1 –15.
- Morgan F, Bonnin V., Mallereau M.P., Perring G., (2001). Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. *International J. of Food Microbiology* 64, 217-21
- Moshtaghi, H., Mohamadpour, A.A., 2007. Incidence of *Listeria* spp. in raw milk in Shahrekord, Iran. *Foodborne Pathogens Dis.* 4, 107e110.

- Norrung, B., (2000). Microbiological criteria for *L. monocytogenes* in foods under special consideration of risk assesment approaches. International Journal of Microbiology 62, 217-221
- Orsi Renato H., Henk C. den Bakker, Martin Wiedmann Mini review *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics International Journal of Medical Microbiology 301 (2011) 79–96
- Pilo A.L. et al. (2007) Proceedings XVI ISOPOL (Savannah, Georgia, USA, March 20-23.
- Mirella Pontello, Anna Guaita, Giuliana Sala, Monica Virginia Gianfranceschi, Antonietta Gattuso e Michele Sonnessa Sierotipi di *Listeria monocytogenes* emergenti nella popolazione italiana (2000-09) Ben Notiziario ISS Volume 24 numero 3 marzo 2011
- Pini, P.N., Gilbert, R.J., 1988. The occurrence in the UK of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. Int. J. Food Microbiol. 6, 317-326
- Pisanu S., Mazzette R. (1992). *Presenza di Listeria spp. In alcuni alimenti di origine animale*. Atti XLVI Convegno Nazionale SISvet, Venezia S.Giuliano 30 Settembre-1-2-3 Ottobre.
- Ramaswamy, V., Cresence, V. M., Reijitha, J. S., Lekshmi, M. U., Dharsana, K. S., Prasad, S. P., et al. (2007). *Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 40, 4e13.

- RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) un'allerta (notification detail – 2012.1395) per “*Listeria monocytogenes* (presence/25g) in ricotta cheese from Italy”.
- Reg. (CE) 882/2004
- Reg. (CE) 2073/2005
- Regolamento (CE) n. 178 del 28 gennaio 2002
- Regolamento (CE) n.178/2002 del 28 gennaio 2002: allerta comunitaria
- Rocourt J., Cossart P., (1997) *Listeria monocytogenes*, in Food. Microbiology Fundamentals and Frontiers, edited by Doyle M.B., Beuchat L.R., Montville T.J., ASM Press., Washington D.C., 337-352
- Rogga K.J., Samelis J., Kakouri A., Katsiari M.C., (2005). Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4°C and 12°C. International Dairy Journal 15, 59-67
- Salamina, G., Donne, E.D., 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, 429-436.
- Sauders, et al. Appl. Environ. Microbiol. doi:10.1128/AEM.00282-12 AEM Accepts, published online ahead of print on 13 April 2012
- Seeliger HP, and Jones D. 1986. *Listeria*, p. 1235-1245. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore

- Skogberg K., Syrjanne J., Renkonen, O.V., Paavonen J., Ahonen J., Ruutu O., Valtonen, V., (1992). Clinical presentation and outcome of listeriosis in patients with and without immunosuppressive therapy. *Clin. Infect. Dis.* 14, 815-821
- Solano-Lopez C., Hernandez-Sanchez H., (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Manchego and Chihuahua Mexican Cheeses. *International J of Food Microbiology* 62, 149-153.
- Southwick F.S., Purish D.L.,(1996). Intracellular pathogenesis of listeriosis, *the New England Journal of Medicine*, vol. 334, 12, 770-776
- Stuart SE, and Welshimer HJ. 1974. Taxonomic reexamination of *Listeria Pirie* and transfer of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a new genus, *Murraya*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24:177-185.
- Swaminathan B (2001) *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (BeuchatLR., et al., eds), pp. 383–409. ASM Press, Washington.
- UE Notice N° 2008/C 111/17, 2008. Publication of an amendment application pursuant to Article 6(2) of Council Regulation (EC) No 510/2006 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs. *Official Journal of the European Union* 111/51–111/55 (6-April-).

- UNI EN ISO 11290-1 UNI EN ISO 11290-1, 2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: detection method.
- UNI EN ISO 11290-1 UNI EN ISO 11290-2, 2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 2 : enumeration method.
- Van Kessel, J.S., Karns, J.S., Gorski, L., McCluskey, B.J., Perdue, M.L., 2004. Prevalence of *Salmonellae*, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. *J. Dairy Sci.* 87, 2822e2830.
- Vaneechoutte M, Boerlin P, Tichy HV, Bannerman E, Jager B, and Bille J. 1998. Comparison of PCR-based DNA fingerprinting techniques for the identification of *Listeria* species and their use for atypical *Listeria* isolates. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 Pt 1:127-139.
- Walter F. Schlech III. *Gram-Positive Pathogens* Ed. A.Fischetti et al., Washington 2000, 473-513.
- Wiedmann M., Roberts A. J.- Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis -CMLS, CMLS, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 904–918