



**uniss**  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA**  
**CORSO DI DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE**  
**INDIRIZZO: PRODUZIONE, QUALITÀ E SICUREZZA ALIMENTARE**  
**CICLO: XXXIII**  
**Coordinatore del Corso Prof.ssa Fiammetta Berlinguer**

**Studio dell'efficacia di colture protettive ed  
innovazione di processo per garantire la sicurezza  
alimentare di un formaggio ovino fresco**

**Tutor:**  
**Prof. Christian Scarano**

**Dottorando**  
**Dott.ssa Mariella Demontis**

**Anno Accademico 2021 - 2022**

## Sommario

<b>PREMESSA</b> .....	5
<b>CARATTERISTICHE GENERALI DEL MICRORGANISMO</b> .....	9
Tassonomia.....	9
Principali caratteristiche di <i>L. monocytogenes</i> .....	9
Patogenicità e principali sierotipi.....	11
Fattori di virulenza.....	13
<b>PATOGENESI ED EPIDEMIOLOGIA</b> .....	17
Epidemiologia della listeriosi nell'uomo.....	17
Ecologia di <i>Listeria monocytogenes</i> .....	20
Definizione delle condizioni di crescita.....	22
<b>LISTERIOSI</b> .....	24
<i>Listeria monocytogenes</i> nell'uomo .....	25
<i>Listeria monocytogenes</i> negli animali .....	27
<i>Listeria monocytogenes</i> nell'ambiente.....	28
Listeria e resistenza agli antibiotici.....	30
Listeria spp. e <i>Listeria monocytogenes</i> negli alimenti.....	34
Cibi pronti al consumo (Ready-to-eat foods RTE) .....	35
Criteri internazionali di sicurezza alimentare microbiologica per <i>Listeria monocytogenes</i> ..	36
<i>Listeria monocytogenes</i> nel settore lattiero-caseario.....	37
Latte.....	40
<i>Listeria monocytogenes</i> nei prodotti lattiero-caseari.....	40
<b>BATTERIOCINE</b> .....	41
Classificazione, biosintesi e meccanismo d'azione delle batteriocine .....	43
Batteri lattici produttori di batteriocine (LAB).....	46
<i>Lactobacillus plantarum</i> .....	48
Pediocina .....	50
Applicazione di batteriocine purificate/semipurificate ai prodotti lattiero-caseari .....	51
<b>SCOPO DELLA TESI</b> .....	54

<b>MATERIALE E METODI</b> .....	<b>56</b>
<b>Tecnologia di produzione del Primo Sale</b> .....	<b>56</b>
<b>Campionamento Primo Sale</b> .....	<b>56</b>
<b>Analisi parametri chimici: pH e aw</b> .....	<b>57</b>
<b>Analisi microbiologiche: ricerca di <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Listeria spp.</i></b> .....	<b>57</b>
<b>Rilevazione e mappatura dei siti di contaminazione da <i>Listeria monocytogenes</i> negli ambienti di produzione</b> .....	<b>58</b>
<b>Analisi microbiologica dei campioni ambientali: ricerca di <i>Listeria monocytogenes</i></b> .....	<b>59</b>
Identificazione molecolare degli isolati .....	59
Estrazione del DNA.....	59
Identificazione dei ceppi mediante multiplex PCR.....	60
Determinazione del sierotipo de ceppi di <i>L. monocytogenes</i> ambientali mediante multiplex	61
Curva di crescita ceppi di <i>Listeria monocytogenes</i> appartenenti a diversi sierotipi.....	63
<b>Caratterizzazione in vitro dell'attività antilisterica di <i>L. plantarum</i></b> .....	<b>64</b>
Curva di crescita di <i>Lactobacillus plantarum</i> ( <i>Listeria Dairy</i> , Danisco Holdbac) .....	64
Determinazione dell'attività antimicrobica di <i>L. plantarum</i> : ruolo del mezzo di coltura e della temperatura di incubazione .....	65
Caratterizzazione dell'attività antilisterica del surnatante di colture di <i>L. plantarum</i> .....	67
Preparazione del surnatante privo di cellule (CFS).....	67
Inibizione dell'attività del surnatante ottenuto da colture di <i>L. plantarum</i> in seguito al trattamento con proteasi .....	68
Analisi molecolare del genoma di <i>L. plantarum</i> per la ricerca dei geni correlati alla pediocina .....	70
<b>Caratterizzazione in vivo dell'attività antilisterica di <i>L. plantarum</i></b> .....	<b>71</b>
Curva di crescita di <i>L. plantarum</i> in differenti matrici: latte ovino pastorizzato, siero di latte, scotta.....	72
Preparazione della coltura madre di <i>L. plantarum</i> in scotta.....	73
Campionamento e analisi dei parametri chimici e microbiologici.....	73
<b>Challenge test primo sale</b> .....	<b>74</b>
Piano di campionamento .....	74
Preparazione dell'inoculo sperimentale .....	75
Preparazione dei campioni .....	76
Determinazione dei batteri lattici e analisi quantitativa e qualitativa di <i>Listeria monocytogenes</i> .....	76
<b>RISULTATI</b> .....	<b>77</b>

<b>Campionamento Primo Sale .....</b>	<b>77</b>
<b>Analisi parametri chimici: pH e aw .....</b>	<b>77</b>
<b>Analisi microbiologica: ricerca di <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Listeria spp.</i> .....</b>	<b>78</b>
<b>Rilevazione e mappatura dei siti di contaminazione da <i>Listeria monocytogenes</i> negli ambienti di produzione .....</b>	<b>78</b>
Analisi microbiologica dei campioni ambientali: ricerca di <i>Listeria monocytogenes</i> e identificazione molecolare degli isolati mediante multiplex PCR .....	79
Determinazione del sierotipo di appartenenza dei ceppi di <i>Listeria monocytogenes</i> .....	80
<b>Curva di crescita ceppi di <i>Listeria monocytogenes</i> a diverse temperature di incubazione.....</b>	<b>82</b>
<b>Caratterizzazione in vitro dell'attività antilisterica di <i>L. plantarum</i> .....</b>	<b>85</b>
Curva di crescita di <i>Lactobacillus plantarum</i> ( <i>Listeria Dairy</i> , Danisco Holdbac) .....	85
Determinazione dell'attività antimicrobica di <i>L. plantarum</i> : ruolo del mezzo di coltura e della temperatura di incubazione.....	86
Caratterizzazione dell'attività antilisterica del surnatante di colture di <i>L. plantarum</i> .....	87
Inibizione dell'attività del surnatante ottenuto da colture di <i>L. plantarum</i> in seguito al trattamento con proteasi .....	91
Analisi di spettrometria di massa per l'identificazione del composto con attività antilisterica prodotto da <i>L. plantarum</i> .....	92
Analisi molecolare del genoma di <i>L. plantarum</i> per la ricerca dei geni correlati alla pediocina .....	98
<b>Caratterizzazione in vivo dell'attività antilisterica di <i>L. plantarum</i> .....</b>	<b>99</b>
Preparazione della coltura madre di <i>L. plantarum</i> in scotta.....	102
Campionamento e analisi dei parametri chimici e microbiologici.....	103
<b>Challenge test Primo Sale .....</b>	<b>105</b>
<b><i>DISCUSSIONE</i> .....</b>	<b>110</b>
<b><i>CONCLUSIONI</i> .....</b>	<b>115</b>
<b><i>BIBLIOGRAFIA</i>.....</b>	<b>122</b>

## PREMESSA

Come altre attività agro-zootecniche 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. Inoltre, negli ultimi anni la percezione del rischio da parte del consumatore è aumentata esponenzialmente 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 un ruolo di primaria importanza *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), l'agente eziologico della listeriosi, una malattia a carattere zoonotico che viene contratta attraverso l'ingestione di alimenti contaminati. Gli alimenti sono considerati il principale veicolo per la trasmissione di *L. monocytogenes* e particolare significato hanno cibi pronti al consumo (RTE: Ready to Eat Foods), i quali sono definiti come “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 2073/05 ) e dei quali fanno parte anche i prodotti lattiero-caseari. In questi ultimi, infatti, è stato evidenziato come le possibilità di contaminazioni ambientali siano strettamente correlabili alle caratteristiche fisico-chimiche e strutturali del prodotto che possono favorire od inibire l'insediamento di *L. monocytogenes* (Almeida et al., 2013).

Negli ultimi due decenni si è registrato un aumento dei focolai su larga scala (Desai et al., 2019). Nell'Unione Europea è stata segnalata una tendenza crescente di casi confermati di listeriosi, nel periodo tra il 2013 e il 2020 con 1.876 casi umani confermati solo nel 2020 (EFSA & ECDC, 2021). Nel 2012 negli Stati Uniti proprio un prodotto importato dall'Italia, la ricotta salata, 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 dello stesso anno 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).

Il Regolamento (CE) 178/2002 stabilisce all'art. 17 che la responsabilità primaria della sicurezza alimentare spetta agli operatori del settore alimentare (OSA), i quali sono tenuti a garantire che nelle imprese da essi controllate gli alimenti soddisfino le disposizioni della legislazione alimentare inerenti alle loro attività in tutte le fasi di produzione, trasformazione e distribuzione e a verificare che tali disposizioni siano soddisfatte (principio generale della responsabilità). Il Regolamento (CE) 852/2004, a sua volta, stabilisce che gli OSA si accertino dell'applicazione dei criteri. Ai sensi del regolamento (CE) n. 2073/2005 (Commissione europea, 2005) relativo ai criteri microbiologici per i prodotti alimentari, gli OSA garantiscono la conformità dei loro prodotti ai limiti fissati dal regolamento fino alla fine della data di scadenza o del termine minimo di conservazione (Reg. CE 2073/05).

La presenza di *L. monocytogenes* negli alimenti 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.

*L. monocytogenes* è un microrganismo ubiquitario e, a causa della sua capacità di tollerare vari stress ambientali, è in grado di sopravvivere per lunghi periodi in ambienti ostili come gli impianti di lavorazione degli alimenti dove viene di solito introdotto attraverso il trasporto di materiali contaminati o dal movimento di persone e attrezzature, persistendo nell'ambiente anche in seguito a procedure di pulizia e sanificazione inefficaci (Tompkin et al., 2002; Carpentier & Cerf, 2011; Ferreira et al., 2014).

Poiché le conseguenze della listeriosi sulla salute pubblica sono così gravi, la persistenza del patogeno negli ambienti di trasformazione alimentare e la potenziale contaminazione crociata con gli alimenti, rappresenta un grave problema per l'industria alimentare.

Dal momento che la listeriosi è una malattia ad origine alimentare, è possibile mettere in atto strategie mirate alla riduzione della contaminazione batterica e al verificarsi degli episodi di listeriosi. Tali strategie si basano principalmente su due punti fondamentali: adozione di adeguate misure igienico- sanitarie negli ambienti di trasformazione degli alimenti e utilizzo di sostanze antimicrobiche in grado di prevenire o contrastare la contaminazione degli alimenti da parte del patogeno. In generale, l'industria alimentare per la conservazione dei prodotti alimentari e per

aumentare la durata di conservazione degli stessi si serve principalmente di sostanze chimiche come nitriti e anidride solforosa. L'uso eccessivo di conservanti chimici oltre a provocare talvolta effetti negativi sulla salute umana e sul livello nutrizionale degli alimenti, causando una riduzione della sicurezza e della qualità standard degli alimenti stessi, è spesso alla base dello sviluppo di resistenze da parte dei batteri patogeni contaminanti (Saeed et al., 2009). Viste tali considerazioni è basilare lo sviluppo di nuove metodologie di conservazione degli alimenti, che siano in grado di aumentarne la shelf - life senza modificarne lo stato nutrizionale o la sicurezza. (Galvez et al., 2014; Song et al., 2014). A questo proposito, alcuni batteri lattici (LAB: lactic acid bacteria) hanno mostrato un grande potenziale nella conservazione degli alimenti e sembra che siano in grado di ridurre o eliminare la necessità di aggiungere additivi chimici garantendo alimenti di alta qualità (Perez et al., 2014). Infatti, alcuni membri del gruppo LAB esercitano un'attività antagonistica contro i batteri patogeni secernendo diversi metaboliti come perossido di idrogeno, acidi organici e peptidi antibatterici noti come batteriocine. Queste ultime, sintetizzate a livello ribosomiale dai batteri, in particolari circostanze, sono in grado di inibire la crescita di ceppi batterici simili o strettamente correlati (Nishie et al. 2012). Le batteriocine prodotte dai LAB svolgono un ruolo molto importante nell'industria alimentare come conservanti naturali e la maggior parte di esse sono generalmente riconosciute come sicure (GRAS: Generally Recognized As Safe) (Kumar et al. 2016; Lan et al. 2012; Merzoug et al. 2016). Il principale vantaggio dell'uso di peptidi antimicrobici è che potrebbero preservare il cibo senza modificarne la qualità e non sono dannosi per la salute umana (Todorov et al., 2009).

*Lactobacillus plantarum* è uno dei membri del gruppo dei LAB e partecipa alla fermentazione di molti prodotti vegetali (insilato, crauti, olive in salamoia, sottaceti), lievito madre, formaggi, salsicce fermentate e stoccafisso (Cebeci & Gürakan, 2003). Si tratta di un batterio probiotico appartenente al genere *Lactobacillus* che abita l'apparato digerente umano e produce batteriocine, esopolisaccaridi, proteine extracellulari e acidi lipoteicoici (Arasu et al., 2016). Studi comparativi tra diversi probiotici hanno dimostrato che i ceppi di *L. plantarum* possiedono il più ampio spettro di attività antimicrobica tra i batteri probiotici esaminati (Davoodabadi et al., 2015; Dembélé et al., 1998; Dubourg et al., 2015; Ren et al., 2014; Wang et al., 2010). Considerando la crescente

importanza dei LAB come alternativa agli antibiotici, la conoscenza dell'attività antimicrobica delle principali specie di questo gruppo in generale, e di *L. plantarum* in particolare, è di grande significatività in quanto l'attività antimicrobica esercitata dal probiotico potrebbe essere utile nella prevenzione dello sviluppo di microbiota indesiderati nei prodotti alimentari (Coughlan, et al. 2016).

Negli ultimi anni sono state segnalate varie batteriocine prodotte da diversi ceppi di *Lactobacillus plantarum* (Atrih et al., 2001; Ennahar et al., 1996; Todorov et al., 2009) tra cui diversi tipi di plantaricina (pln) (Messi et al., 2001; Kleerebezem et al., 2003; Navarro et al., 2008; Rojo-Bezares et al., 2007). È noto, inoltre, che alcuni ceppi di *L. plantarum* sono in grado di secernere anche un altro tipo di batteriocina, la pediocina, che è prodotta solitamente da un altro gruppo di batteri appartenenti alla specie *Pediococcus acidilactici* (Duffes et al., 2000). Lo spettro di attività di tale batteriocina è relativamente ampio e mostra un meccanismo d'azione battericida che porta alla lisi delle cellule (Montville et al., 1998; Xie et al., 2011).

L'utilizzo di LAB produttori di batteriocine con lo scopo di migliorare la sicurezza alimentare è promettente, ma quando si costruisce una strategia di bioconservazione, è essenziale comprendere il meccanismo d'azione utilizzato dai diversi ceppi batterici prima che questi possano essere adoperati come efficienti agenti bioprotettivi negli alimenti.

In questo contesto, lo scopo di questo studio è quello di valutare l'attività antimicrobica di una coltura bioprotettiva commerciale di *Lactobacillus plantarum* (*Listeria Dairy Holdbac*, Danisco), per il controllo *in vitro* di ceppi di *Listeria monocytogenes* e identificare le caratteristiche fisico-chimiche della sua batteriocina anti-*Listeria*. Il fine ultimo è quello di trasferire nella pratica le informazioni ottenute da tale studio per prevenire la contaminazione di prodotti caseari freschi e fornire all'industria casearia un'importante mezzo di lotta contro la contaminazione da *L. monocytogenes*.



## CARATTERISTICHE GENERALI DEL MICRORGANISMO

### Tassonomia

Nel 1926 la *Listeria* venne isolata per la prima volta da *Murray et al.* da conigli e cavie a seguito di un'epidemia spontanea. Furono i primi a descrivere dettagliatamente il microrganismo e ad attribuirgli il nome *Listeria monocytogenes* poiché, negli animali colpiti, era responsabile di una grave monocitosi. Nell'uomo il primo isolamento risale, invece, al 1929 dal sangue di pazienti affetti da una malattia simile alla mononucleosi. Nel 1936 Burn riferì, inoltre, la capacità di questo microrganismo di provocare meningite negli adulti ed infezioni perinatali (McLauchlin, 1987).

*L. monocytogenes* è un batterio Gram-positivo, anaerobio facoltativo e asporigeno appartenente al genere *Listeria*, alla famiglia delle *Listeriaceae* e all'ordine *Bacillales* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001). Attualmente al genere *Listeria*, oltre a *Listeria monocytogenes*, appartengono altre 16 specie: *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae*, e *L. newyorkensis* tuttavia, quelle maggiormente isolate dalle infezioni cliniche sono *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* (Sauders & Wiedmann, 2007; Weller et al., 2015).

### Principali caratteristiche di *L. monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* è un batterio di forma bastoncellare con lunghezza compresa tra 0,5 e 2  $\mu\text{m}$  e larghezza di 0,4-0,5  $\mu\text{m}$ , catalasi positivo e ossidasi negativo (Farber et al., 1991). Le colonie hanno un aspetto tondeggianti, sono traslucide e leggermente convesse (Gray et al., 1966), di colore giallo se coltivate su terreni arricchiti (Tryptone Soy Agar, TSA) e azzurro-grigio su terreni specifici (Lithium Chloride-Phenylethanol-Moxalactam) (Murray PR). La capacità di muoversi, a temperature comprese tra 20 e 25°C, è favorita dalla presenza di un flagello peritrico ma è, tuttavia, inibita a temperature superiori a 35 °C (Fabbi et al., 2005). Il suo optimum di crescita è compreso tra 30 e 37°C (AFSSA, 2000) e non

è in grado di sviluppare e moltiplicarsi a temperature di congelamento o superiori ai 50°C (Fabbi et al., 2005). Alcuni autori (Fleming et al., 1985) sostengono tuttavia, che questo microrganismo possieda una tolleranza termica superiore a quella degli altri patogeni non sporigeni presenti negli alimenti; è, infatti, in grado di sopravvivere a condizioni avverse rappresentate dall'applicazione delle temperature di refrigerazione (2°- 4°C), un intervallo di pH compreso tra valori di 4,0-5,0, alte concentrazioni saline (11,5 % NaCl) e attività libera dell'acqua ( $a_w$ ) compresa tra 0,90 e 0,92 (Prencipe et al., 2012). L'effetto dello shock termico su *L. monocytogenes* è, in realtà, subordinato alla temperatura e alla durata del trattamento stesso: alte temperature e trattamenti lunghi ne aumentano, infatti, la resistenza (Linton et al., 1992). Inoltre, a livello domestico, la temperatura dei frigoriferi è molto più vicina ai 9°C piuttosto che ai 4°C (Sergelidis et al., 1997) e, per tale motivo, in questo contesto il controllo delle contaminazioni da parte del microrganismo patogeno risulta particolarmente complesso (Prencipe et al., 2012). In genere, *L. monocytogenes* si sviluppa meglio in un ambiente leggermente alcalino e cresce bene quindi a valori di pH pari a 9,6, con un optimum di 7,1 (Gray et al., 1966). Tuttavia, in alcuni studi è stato dimostrato come questo microrganismo sia in grado di sopravvivere a valori di pH fortemente acidi, caratteristici dello stomaco umano e dei fagosomi macrofagici, grazie a specifici meccanismi di omeostasi interna basati sulla presenza di trasportatori di membrana e di particolari sistemi tampone (Cotter et al., 2003). La protezione crociata nei confronti di fattori potenzialmente dannosi, compreso lo stress osmotico è, infatti, dovuta alla capacità di tale microrganismo di adattarsi in maniera ottimale all'ambiente acido (Vasseur et al., 2001). Il valore di acqua libera ( $a_w$ ) ottimale per la crescita di *L. monocytogenes* nell'alimento è  $\geq 0,97$ . Il patogeno è, inoltre, alotollerante, cioè capace di crescere a concentrazioni di NaCl pari al 12% e questa capacità spiega il motivo per il quale la conservazione di alcuni alimenti in un ambiente saturo di sale non ha spesso alcun effetto protettivo nei confronti del microrganismo (Fabbi et al., 2005).

*L. monocytogenes* è quindi in grado di sopravvivere e replicare in presenza di piccole variazioni di alcuni parametri ambientali, mentre quando queste sono multiple o di intensità elevata il complesso di risposte che si attiva ne favorisce esclusivamente la sopravvivenza a discapito della sua replicazione (Booth, 1998). È noto, inoltre, che la persistenza del microrganismo negli impianti di

trasformazione degli alimenti per diversi mesi o addirittura anni è dovuta alla sua capacità di aderire ad una varietà di superfici di contatto, come l'acciaio inox e il polistirolo, per mezzo della produzione di biofilm, il che gli consente di sopravvivere anche in presenza di alte concentrazioni di diversi agenti ambientali, quali disinfettanti ed antibiotici (Valimaa et al., 2015).

### **Patogenicità e principali sierotipi**

I ceppi di *L. monocytogenes* presenti in natura differiscono per il loro potenziale epidemiologico e per la loro capacità di provocare malattia nell'uomo (Martin et al., 2014). La variabilità della virulenza dei diversi sottotipi, che condiziona l'evoluzione della malattia, la gravità delle manifestazioni cliniche ed il livello di esposizione delle categorie ad alto rischio, è fortemente correlata sia al numero di microrganismi necessari per indurre l'infezione (Griffiths, 2003), sia all'appartenenza degli stessi ad un determinato sierotipo (Su et al., 2016). I ceppi di *L. monocytogenes* possono essere, infatti, raggruppati in quattro differenti linee evolutive (I-IV) e 13 sierotipi (Martin et al., 2014). Tuttavia, si stima che circa il 98% dei casi di listeriosi umana siano causati dai sierotipi 1/2a, Lineage II, 1/2b e 4b, stirpe I (Ciolacu et al., 2015). Tra questi il sierotipo 4b è quello responsabile della maggior parte delle epidemie, mentre i sierotipi 1/2a, più frequentemente isolati dal cibo, e 1/2b sono invece responsabili di casi sporadici di infezione (Borucki et al., 2003). Non sembra esistere alcuna correlazione tra i diversi sierotipi e le diverse forme di listeriosi, tuttavia, secondo alcuni studi le forme di listeriosi perinatale potrebbero essere associate ai sierotipi 1/2b, 3b e 4b (Farber et al., 1991). Sembra, inoltre, esistano delle differenze geografiche relativamente alla distribuzione a livello globale dei diversi sierotipi: il sierotipo 4b si riscontra maggiormente nei paesi Europei, mentre i sierotipi 1/2a, 1/2 b e 4b sono distribuiti in maniera uniforme negli Stati Uniti e nel Canada (Farber et al., 1991). La maggiore virulenza dei ceppi 1/2a, 1/2b e 4b potrebbe essere legata ad alcune caratteristiche particolari. È stato osservato, per esempio, che i ceppi appartenenti al sierotipo 1/2a sono in grado di replicarsi nell'alimento con velocità ed intensità maggiore rispetto agli altri sierotipi, posseggono una maggiore resistenza al passaggio in ambiente gastrico e sopravvivono meglio alle batteriocine ad una temperatura di 4°C rispetto ai ceppi appartenenti al sierotipo 4b (Rocourt, 1996;

Fabbi et al., 2005). Al contrario, gli isolati di *L. monocytogenes* appartenenti al sierotipo 4b sopravvivono meglio, rispetto ai sierotipi 1/2a, al trattamento con calore (37°C) successivo alla refrigerazione, mostrando talvolta una patogenicità superiore. Per questo, nonostante i ceppi isolati da alimenti appartengano per la maggior parte al gruppo antigenico 1/2 (1/2a, 1/2b, 1/2c) ed al sierotipo 1/2a (Rocourt,1996) mentre quelli appartenenti al sierotipo 4b si riscontrano generalmente soltanto nel 10-12% degli alimenti contaminati, le suddette caratteristiche giustificano la loro maggiore capacità patogena per l'uomo (Fabbi et al., 2005). La ricerca dei principali sierotipi nei prodotti alimentari risulta quindi essere fondamentale poiché costituiscono un potenziale rischio per la salute pubblica (Wang et al., 2017).

Numerose tecniche molecolari hanno permesso di distinguere i vari sierotipi in tre principali divisioni filogenetiche. Alla prima divisione (Lineage I) appartengono i sierotipi 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e; la seconda (Lineage II) comprende invece i sierotipi 1/2a, 1/2c, 3a e 3c, mentre alla terza (Lineage III) appartengono quelli meno comuni quali il 4a e il 4c (Borucki et al., 2003).

Le metodiche molecolari utilizzate per determinare il sierotipo di appartenenza di un determinato ceppo sono numerose. La sierotipizzazione classica permette di discriminare i principali sierotipi, mentre metodiche di tipizzazione molecolare come l'elettroforesi in campo pulsato (PFGE) e la Multilocus Sequence Typing (MLST) utilizzate per l'identificazione dei sottotipi di *L. monocytogenes* sono invece altamente discriminatorie e riproducibili e sono ampiamente utilizzate nelle indagini sui focolai per l'identificazione delle fonti di contaminazione e delle vie di trasmissione (Martin et al., 2014). Negli ultimi anni stiamo assistendo all'utilizzo esponenziale del sequenziamento dell'intero genoma batterico (Whole genome sequencing -WGS) mediante la tecnologia del Next generation sequencing (NGS). La possibilità di ottenere in tempi rapidi la sequenza di interi genomi fornisce uno strumento di caratterizzazione altamente discriminante per la sorveglianza epidemiologica, da impiegare nelle indagini relative ai casi di listeriosi, nell'identificazione di outbreak, negli studi di source attribution, nonché nelle attività di valutazione del rischio legato ai patogeni alimentari, consentendo una più mirata identificazione dei pericoli (EFSA and ECDC, 2019; Pettengill et al., 2014). I metodi di tipizzazione basati sul WGS hanno sostituito definitivamente quelli

tradizionali ed in particolare la PFGE, per anni considerata il gold-standard per la tipizzazione degli isolati batterici (ECDC, 2016).

La specie *L. monocytogenes* presenta una grande eterogeneità genetica: al suo interno i ceppi possono essere raggruppati in 5 diversi sierogruppi, ulteriormente suddivisi su base fenotipica in 13 sierotipi, ed in vari Multi-locus Sequence Typing (MLST) Clonal Complex (CCs). Definire l'appartenenza degli isolati di *L. monocytogenes* ad un determinato sierogruppo/sierotipo o con maggior potere discriminante, ad un CC (MLST), consente di individuare quelli più spesso associati a casi di listeriosi nell'uomo o più frequentemente isolati da specifiche categorie di alimenti, ottenendo informazioni importanti da un punto di vista epidemiologico (EFSA and ECDC, 2019).

Il fattore limitante in quella che è ormai la nuova era della biologia molecolare, non è tanto la possibilità di acquistare piattaforme NGS e di generare sequenze "home made", ma la capacità di assemblare, maneggiare ed analizzare grandi moli di dati attraverso sistemi standardizzati, ottenendo informazioni da utilizzare a fini diagnostici e di sorveglianza epidemiologica.

In questa ottica il Ministero della Salute ha attivato il "Centro di Referenza Nazionale per Sequenze Genomiche di microrganismi patogeni: banca dati e analisi di bioinformatica" (CRN GenPat) il quale rappresenta una piattaforma nazionale per la raccolta e la conservazione delle sequenze genomiche di microrganismi patogeni, per l'esecuzione di analisi bioinformatiche, l'archiviazione e la condivisione dei risultati. Tale piattaforma rappresenta uno strumento accessibile e di facile utilizzo per l'esecuzione di vari tipi di valutazioni: filogenetiche, presenza/assenza di geni di resistenza ad antibiotici/disinfettanti o di virulenza, ecc. (EFSA and ECDC, 2019).

### **Fattori di virulenza**

La presenza o meno dei fattori di virulenza riflette la patogenicità dei diversi ceppi di *L. monocytogenes* (Du et al., 2017). I fattori di patogenicità che svolgono un ruolo essenziale nel percorso di infezione di *L. monocytogenes* e prevalentemente regolati dal gene PrfA (Ciolacu et al., 2015), possono essere suddivisi in due principali categorie in base alla funzione che svolgono. Alla prima categoria appartengono i fattori di virulenza responsabili dell'adesione ed invasione del microrganismo alle cellule ospite, tra i quali si ricordano:

- l’internalina A e B (InlA e InlB), le più importanti proteine di superficie coinvolte nel meccanismo di penetrazione cellulare delle quali se ne conoscono circa 25. La prima è implicata nell’invasione delle cellule epiteliali intestinali dell’ospite ed interagisce con E-caderina presente sulla superficie delle stesse, attivando il processo di fagocitosi (Ciolacu et al., 2015); la seconda è, invece, coinvolta nell’innescare del meccanismo di invasione di numerose cellule, in particolare di epatociti e fibroblasti, attraverso l’interazione con dei recettori conosciuti come Met, gC1qR e glicosaminoglicani (Fabbi et al., 2005);
- IAP (Invasion Associated Protein): denominata anche p60, sembra sia coinvolta nel processo di invasione dei fibroblasti (Swaminathan, 2001; McLaughlin et al., 2004) e svolga un’importante funzione nella fase tardiva del processo di divisione cellulare per la sua attività idrolasica nei confronti della mureina (Schmid et al., 2005);
- ActA: media l’adesione e l’ingresso del patogeno all’interno delle cellule ospite determinando la polimerizzazione dei monomeri di actina cellulare in una rete di filamenti che si dispongono ad un polo della cellula batterica e ne indirizzano lo spostamento verso la membrana plasmatica della cellula ospite. Questo meccanismo favorisce il passaggio di *L. monocytogenes* da una cellula all’altra evitando il contatto con i liquidi organici e quindi gli anticorpi dell’ospite (Kocks et al., 1992);
- Ami: è una proteina di superficie che interviene nell’adesione di *L. monocytogenes* con le cellule epiteliali e gli epatociti dell’ospite (McLaughlan et al., 1998);
- FbpA: Fibronectina binding protein A, è una proteina esposta sulla superficie cellulare di *L. monocytogenes* ed è in grado di modulare i livelli di Listeriolisina O ed InlB prevenendo la degradazione dei principali fattori di virulenza (Dramsì et al., 2004);
- Listeriolisina O (LLO): è una tossina batterica ed insieme alle due fosfolipasi PlcA o PlcB, opera la distruzione del fagosoma attraverso la formazione di pori nella membrana, i quali causano un’alterazione degli equilibri ionici con successiva disgregazione del fagosoma e liberazione del batterio nel citoplasma. Tale tossina è in grado di innescare diverse risposte cellulari quali la secrezione di Interleukina-1 da parte dei macrofagi, il

processo di apoptosi delle cellule dendritiche, di adesione cellulare e di espressione di molecole di adesione delle cellule epiteliali infette (Gedde et al., 2000);

- PlcA e PlcB: sono due fosfolipasi responsabili della diffusione del patogeno nelle cellule adiacenti mediante la distruzione del vacuolo litico. Infatti, mentre PlcA è responsabile della lisi della membrana singola del fagolisosoma primario, PlcB contribuisce alla lisi del vacuolo a membrana doppia che si forma durante il processo di diffusione intracellulare nel passaggio di *L. monocytogenes* dalla cellula ospite alla cellula adiacente (Cossart et al., 2008);

Della seconda categoria fanno parte, invece, i fattori di virulenza implicati nel ciclo di vita intracellulare, in particolare:

- Fosfolipasi C: caratteristica della sola specie *L. monocytogenes* e di alcuni ceppi di *L. ivanovii*, in associazione con la Listeriolisina O favorisce l'uscita dal primo vacuolo fagocitario e determina in seguito la dissoluzione della doppia membrana dopo la diffusione da cellula a cellula (Vazquez-Boland et al., 2001a; Mc Lauchlin et al., 2004);
- Metallo proteasi (Mpl): è una proteina zinco-dipendente che contribuisce all'attivazione ed alla maturazione delle fosfolipasi e della cisteina della cellula ospite (Vazquez-Boland et al., 2001a).

I primi geni identificati furono *inlA* e *inlB* che codificano rispettivamente le internaline A e B (Gaillard et al., 1987). Successivamente, vennero individuati altri sei fattori di virulenza (*prfA*, *plcA*, *plcB*, *hly*, *mpl* e *actA*), raggruppati in seguito in un cluster di 6 geni (9 kb), precedentemente conosciuto come pVGC (Virulence gene cluster) e ora definito LIP 1 (*Listeria pathogenicity island*) (Di Ciccio et al., 2009). Tutti i geni codificanti per i fattori di virulenza di *Listeria monocytogenes* sono sotto il controllo trascrizionale del fattore di regolazione *prfA* (positive regulatory factor A) (Vazquez-Boland et al., 2001b). L'espressione dei fattori di patogenicità, dipendenti da *prfA*, può essere influenzata da diversi fattori ambientali, infatti, sono responsabili di una loro attivazione, valori di temperatura prossimi a 37°C (Johansson et al., 2002) e la presenza di condizioni di stress (Sokolovic et al., 1990); al contrario l'elevata

concentrazione di ferro e temperature al di sotto dei 20°C si comportano da fattori inattivanti (Renzoni et al., 1999; Goebel et al., 2000; Kreft et al., 2001). Al contrario, i ceppi di *Listeria monocytogenes* che non posseggono il fattore di regolazione e nei quali è soppressa l'espressione dei geni "Listeria pathogenicity island" (LIP 1) e di quelli *inlA* e *inlB*, risultano avirulenti (Chakraborty et al., 1992) (Figura 1).

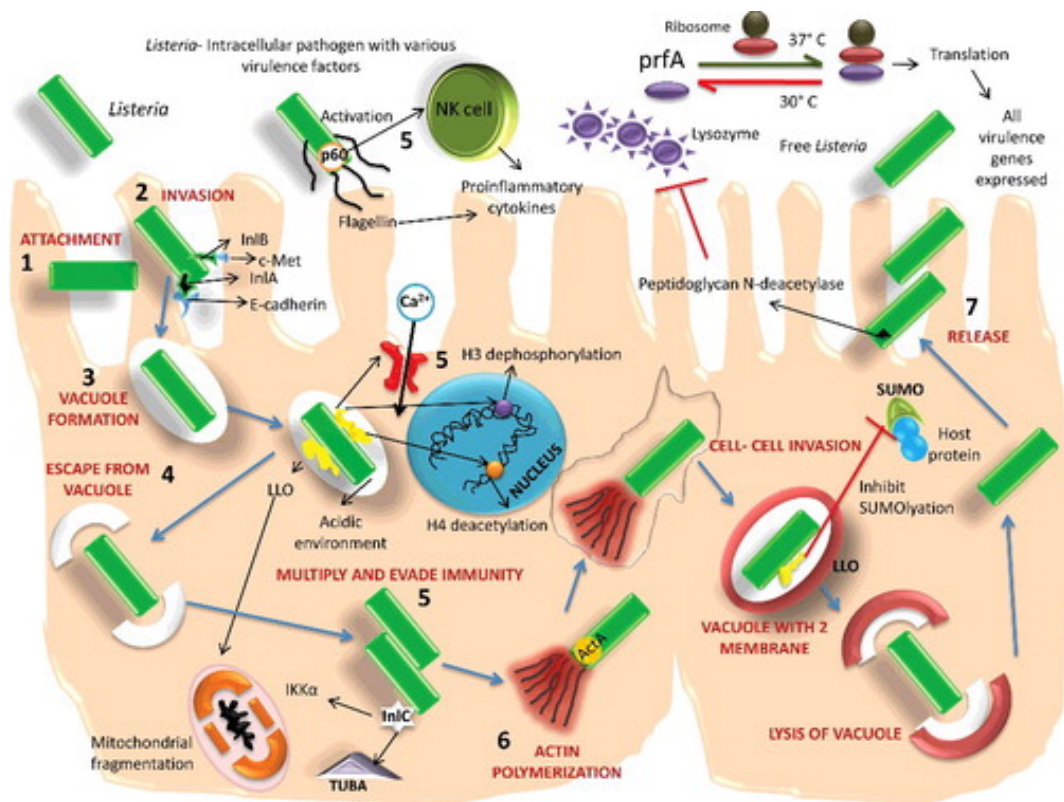


Figura 1 Fattori di virulenza e patogenesi di *Listeria* (Dhama et al., (2015).

<https://www.researchgate.net/publication/278039172>



## PATOGENESI ED EPIDEMIOLOGIA

### Epidemiologia della listeriosi nell'uomo

La listeriosi è definita dall'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) come una malattia rara e decisamente meno comune rispetto ad altre tossinfezioni alimentari come quelle causate da *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni* o *Salmonella spp.* (Manfreda et al., 2005). Tuttavia, nel 2020, il numero di casi confermati di listeriosi umana è stato di 1.876, corrispondente a un tasso di notifica dell'UE di 0,42 per 100.000 abitanti. Negli ultimi 5 anni (2016-2020), si è registrato un maggior numero di segnalazioni di casi nella seconda metà dell'anno (Figura 2). Sebbene nel 2020 sia stata osservata una diminuzione dei casi, dovuto all'uscita del Regno Unito dall'UE, la listeriosi ha avuto la più alta percentuale di casi ospedalizzati di tutte le zoonosi sotto sorveglianza dell'UE (EFSA & ECDC, 2021). Tuttavia, la tendenza generale dell'andamento della listeriosi, in crescita già dal 2014, non ha mostrato modifiche statisticamente significative. Nello specifico, in Italia, nel 2020 sono stati segnalati 147 casi confermati di listeriosi invasiva nell'uomo, con un tasso di notifica di 0,25 casi per 100.000 abitanti. (EFSA & ECDC, 2021). La maggior parte dei casi di listeriosi sono stati segnalati negli anziani, in particolare quelli di età superiore ai 64 anni e questa tendenza può essere parzialmente spiegata dall'invecchiamento della popolazione nell'UE e dall'aumento delle malattie croniche legate all'età (EFSA BIOHAZ Panel, 2020).

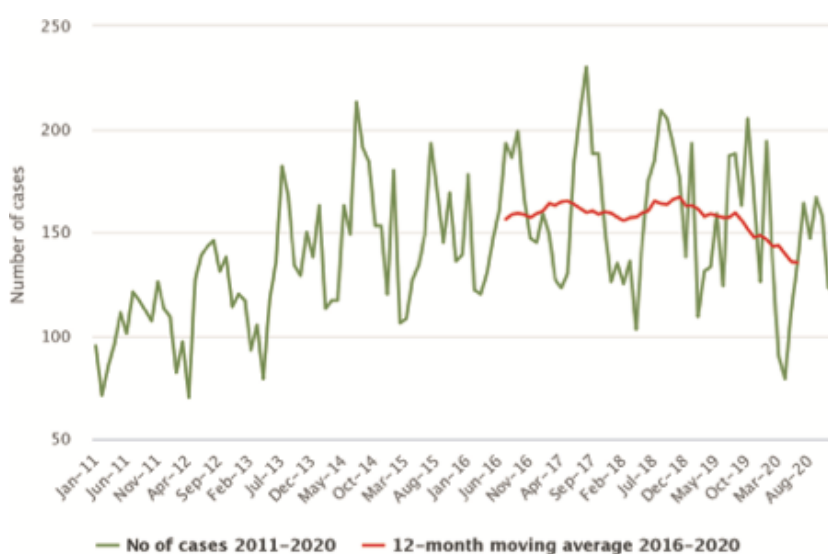


Figura 2 Andamento dei casi di listeriosi umana in Europa dal 2011 al 2020 (EFSA & ECDC, 2021)

Rispetto ad altre zoonosi alimentari, la listeriosi, pur avendo una bassa prevalenza, presenta tassi di ospedalizzazione (97,1 %) e mortalità (13,0%) piuttosto elevati assumendo una particolare rilevanza sanitaria (EFSA & ECDC, 2021). Nei paesi dell'Unione Europea le infezioni da *L. monocytogenes* sono oggetto di sorveglianza in sanità pubblica nell'ambito del programma Foodborne and Waterborne Diseases (FWD) dell'European Centre for Diseases Prevention and Control (ECDC) attraverso il sistema di sorveglianza europeo TESSy (The European Surveillance System) case-based (sorveglianza dei casi clinici di malattia) e TESSy isolate-based (sorveglianza molecolare sugli isolati di Lm) in conformità alla definizione di caso per la listeriosi (Decisione CE n. 945 del 22 Giugno 2018).

Tuttavia, nonostante il numero di casi annualmente registrati (1876 nel 2020 EFSA & ECDC, 2021) non sia molto elevato, le forme cliniche sono particolarmente gravi, con tassi di mortalità più elevati rispetto ad altre malattie di origine alimentare (EFSA & ECDC, 2021). Spesso, inoltre, la listeriosi umana, poiché responsabile di una sintomatologia aspecifica, non viene immediatamente riconosciuta e trattata, e la terapia viene solitamente rimandata alla comparsa di una sintomatologia più grave quale una setticemia, meningite, per la quale rappresenta la terza causa al mondo dopo *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* (Amaya-Villar et al., 2010), meningoencefalite e aborto (Vazquez-Boland et al., 2001a).

La sorveglianza epidemiologica delle malattie a trasmissione alimentare non può prescindere dalla caratterizzazione molecolare degli isolati batterici e dall'individuazione delle correlazioni epidemiologiche tra i ceppi isolati da casi clinici e da alimenti contaminati. Nel caso di *L. monocytogenes*, le tecniche di tipizzazione più utilizzate, per anni, sono state la sierotipizzazione, la Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) e la Multi Locus Sequence Typing (MLST).

Negli ultimi anni stiamo assistendo all'utilizzo esponenziale del sequenziamento dell'intero genoma batterico (Whole genome sequencing - WGS) mediante la tecnologia del Next Generation Sequencing (NGS). La possibilità di ottenere in tempi rapidi la sequenza di interi genomi fornisce uno strumento di caratterizzazione altamente discriminante per la sorveglianza epidemiologica, da impiegare nelle indagini relative ai casi di listeriosi, nell'identificazione di focolai nonché nelle attività di valutazione del rischio legato ai patogeni alimentari, consentendo una più mirata identificazione dei pericoli (EFSA & ECDC, 2019).

Dei 13 diversi sierotipi conosciuti, i sierotipi 1/2a (sierogruppo IIa), 1/2b (sierogruppo IIb) e il 4b (sierogruppo IVb) sono responsabili di circa il 95% dei casi di listeriosi, mentre i sierotipi 1/2a, 1/2b e 1/2c (sierogruppo IIc), sono quelli più frequentemente isolati dagli alimenti. Il sierotipo 4b è quello che presenta la più forte associazione epidemiologica con casi di listeriosi umana ed è più spesso coinvolto in focolai epidemici (Chen et al., 2017; Lee et al., 2018; Montero et al., 2015).

La listeriosi umana è legata principalmente (98% dei casi) all'ingestione di alimenti contaminati da *L. monocytogenes* che nel 2,5% dei casi sono rappresentati dagli alimenti pronti per il consumo: Ready To Eat (RTE). Altre forme di diffusione molto meno frequenti sono, invece, rappresentate dalla trasmissione verticale madre-figlio, da quelle zoonosica e nosocomiale (Ryser, 1999) e per aerosol nei laboratori di analisi (Farber et al., 1999). In Europa e negli Stati Uniti è considerata una malattia condizionata ad andamento sporadico che interessa principalmente alcune categorie di persone maggiormente a rischio (Wiedmann, 2002). La sensibilità dell'ospite gioca, infatti, un ruolo molto importante in particolare nello sviluppo dei sintomi clinici conseguenti all'esposizione a *L. monocytogenes*. Le manifestazioni cliniche assumono particolare gravità in alcune categorie di individui che presentano deficienze fisiologiche o dovute a particolari patologie (Vazquez-Boland et al., 2001a); a maggiore rischio di listeriosi sono, infatti, le donne in gravidanza, i neonati nei primi 30 giorni di vita, gli anziani di età superiore ai 65 anni, gli immunodepressi e gli adulti debilitati da precedenti patologie, quali ad esempio tumori (leucemia, linfomi o sarcomi) e chemioterapia antineoplastica, trapianti d'organo o impiego di corticosteroidi (terapia immunosoppressiva), malattie croniche del fegato (cirrosi o alcoolismo), malattie renali e diabete (McLauchlin, 1990; Schuchat et al., 1991; Farber et al., 1991; Rocourt, 1996; Koch et al., 2006).

La notifica di listeriosi nell'uomo è obbligatoria nella maggior parte degli Stati comunitari. In Italia, la notifica della listeriosi rientra tra quelle con obbligo di denuncia, come previsto per le tossinfezioni alimentari dal decreto ministeriale del 15 dicembre 1990. La notifica della presenza di *L. monocytogenes* nell'alimento è, invece, obbligatoria per undici paesi membri quali Belgio, Estonia, Francia, Germania, Ungheria, Italia, Lettonia, Paesi Bassi, Slovacchia, Slovenia e Spagna (EFSA, 2015). Tuttavia, è possibile che i dati relativi ai casi di listeriosi siano

sottostimati in quanto il sistema di notifica prevede che alla descrizione dei sintomi sia associata l'identificazione microbiologica dell'agente patogeno, la quale viene effettuata di norma solamente nei casi di estrema gravità. Inoltre, il lungo periodo di incubazione della listeriosi (da 1 a 90 giorni) non facilita la raccolta di un'anamnesi attendibile ed il reperimento e l'analisi degli alimenti contaminati (De Cesare et al., 2001).

### **Ecologia di *Listeria monocytogenes***

*L. monocytogenes* è un batterio ampiamente diffuso negli ambienti agricoli, di acquacoltura e di trasformazione alimentare. Una maggiore prevalenza è stata trovata nei terreni più vicini all'acqua, terreni con maggiore umidità, recentemente coltivati e irrigati (Strawn et al., 2013). La sopravvivenza varia in base al tipo di suolo e alle condizioni: i terreni umidi e organici consentono una sopravvivenza più lunga rispetto ai terreni secchi e a bassa organicità (McLaughlin, et al., 2011). *L. monocytogenes* è anche un residente transitorio del tratto intestinale negli esseri umani, infatti, una percentuale di popolazione, compresa tra il 2 e il 10% risulta essere portatore del microrganismo senza apparenti conseguenze per la salute (McLaughlin, et al., 2011).

Gli alimenti sono considerati il principale veicolo per la listeriosi, che negli Stati Uniti è stimata essere per il 99% di origine alimentare (Scallan et al., 2011). Di particolare importanza sono gli alimenti pronti al consumo (RTE), compresi gli alimenti trasformati che sono stati esposti all'ambiente di lavorazione dopo l'applicazione di un processo listericida e prima del confezionamento. Casi sporadici e focolai di listeriosi sono stati generalmente associati a quegli alimenti RTE che sono tenuti per lunghi periodi a temperature di refrigerazione o raffreddamento che consentono la crescita del patogeno il quale arriva ad avere una carica considerevole al momento del consumo (EFSA & ECDC 2016; Figura 3).

Diversi studi hanno dimostrato che *L. monocytogenes* è un patogeno ampiamente distribuito negli ambienti di trasformazione alimentare, nei quali arriva dalle materie prime o dal movimento di persone o attrezzature e può persistere a causa di una serie di fattori: pulizie e servizi igienico-sanitari inefficaci, cattiva progettazione o condizione delle attrezzature e degli ambienti alimentari, controlli

insufficienti del movimento di persone e delle attrezzature all'interno dell'impianto di produzione (Carpentier & Cerf, 2011; Ferreira, et al., 2014; Tompkin, 2002).

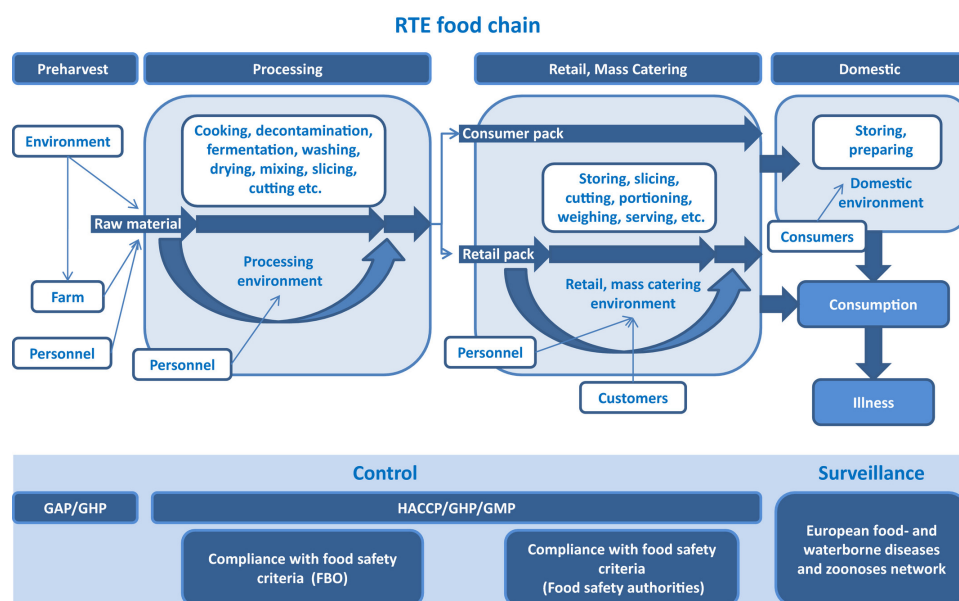


Figura 3 Descrizione schematica delle vie di trasmissione e del sistema di controllo di *Listeria monocytogenes* negli alimenti pronti al consumo (RTE)

Si ritiene che la presenza di *L. monocytogenes* nell'ambiente di trasformazione alimentare sia la fonte primaria di contaminazione post-elaborazione durante la produzione alimentare e in ambienti di vendita al dettaglio o di ristorazione (Malley, Butts, & Wiedmann, 2015). È stato scoperto, infatti, che alcuni ceppi di *L. monocytogenes* sono in grado di persistere per anni o decenni negli impianti di trasformazione alimentare (Ferreira et al., 2014). Tale persistenza può essere dovuta alla sopravvivenza e alla crescita del patogeno in nicchie all'interno dell'ambiente di produzione (ad esempio crepe e fessure di superfici, guarnizioni difficili da pulire e disinfettare) o alla ripetuta reintroduzione di tali ceppi dall'ambiente esterno negli impianti di trasformazione alimentare. La maggior parte delle ricerche sulla persistenza del ceppo si è focalizzata sul ruolo della formazione di biofilm e la tolleranza fisiologica agli ostacoli igienico-sanitari o di lavorazione (Ferreira et al., 2014). I biofilm sono costituiti da più cellule e materiali polimerici extracellulari che proteggono le singole cellule dagli stress ambientali e favoriscono le interazioni tra le cellule in relazione a sostanze nutritive, metaboliti tossici e materiale genetico che possono portare a una maggiore sopravvivenza e crescita. Numerosi ceppi di *L. monocytogenes* sono in grado di formare biofilm, sebbene ci sia una diversità molto ampia tra i ceppi a seconda della composizione del mezzo, nonché del tempo e della temperatura (Bonsaglia et al., 2014).

Un ulteriore possibile meccanismo alla base della persistenza negli ambienti alimentari è la formazione di cellule persistenti. Lo stato dormiente e non divisorio delle cellule persistenti migliora la loro capacità di sopravvivere agli stress ambientali; pertanto, possono rappresentare una strategia di sopravvivenza a lungo termine (LTS: Long Term Survival) per il microrganismo, il quale è in grado di cambiare la propria morfologia passando da una forma bastoncellare ad una forma coccica durante la transizione alla fase LTS. Sebbene i meccanismi alla base di questa transizione morfologica e fisiologica rimangano in gran parte sconosciuti, è dimostrato che tali cellule LTS possiedono una maggiore tolleranza alla temperatura e all'alta pressione (Wen et al., 2011).

Diversi autori sostengono che l'eradicazione definitiva di *L. monocytogenes* dagli ambienti alimentari è altamente improbabile a causa della sua onnipresenza nell'ambiente e di molte potenziali vie di ingresso nella struttura. Pertanto, l'eliminazione e l'esclusione del microrganismo devono essere gestite attivamente, ad esempio mediante un'adeguata progettazione igienica dei locali e delle attrezzature, una pulizia e un'igiene efficaci nonché lo smontaggio di attrezzature per la pulizia profonda (CAC, 2009).

### **Definizione delle condizioni di crescita**

Una varietà di alimenti che supportano la crescita del patogeno è stata implicata in focolai e casi sporadici di listeriosi, come carni lavorate, formaggi a pasta molle, pesce affumicato, burro e latte. Poiché la maggior parte dei prodotti implicati nella listeriosi hanno una durata di conservazione prolungata, il tempo e la temperatura durante il trasporto e lo stoccaggio contribuiscono fortemente al rischio di listeriosi associato agli alimenti RTE (CAC, 2009; Farber, Kozak, & Duquette, 2011).

Il potenziale di crescita di *Listeria* in un particolare alimento durante lo stoccaggio e la distribuzione è stato un fattore chiave nel determinare il livello di rischio per i consumatori ed è stato alla base della categorizzazione del rischio da parte di alcune autorità di regolamentazione (Farber et al., 2011) e dei criteri microbiologici associati (Commissione europea, 2005).

La Commissione del Codex Alimentarius (CAC) ha proposto il seguente criterio per caratterizzare i prodotti alimentari che sostengono la crescita di *L. monocytogenes*: "un alimento RTE in cui vi è un aumento superiore alla media di

0,5 log del livello dell'organismo per almeno la durata di conservazione prevista (come etichettato dal produttore) in condizioni di distribuzione ragionevolmente prevedibili, stoccaggio e utilizzo a consumo, compreso un margine di sicurezza" (CAC, 2009). Sebbene la Commissione europea non abbia formalmente adottato il criterio, sono stati prodotti una serie di documenti di orientamento pratico per aiutare gli Stati membri e le industrie alimentari all'interno dell'Unione europea a valutare il potenziale di crescita di *L. monocytogenes* (Commissione europea, 2013; EURL Lm, 2008).

Gli studi sulla shelf-life non sono necessari quando è sufficientemente documentato che le caratteristiche intrinseche dell'alimento non supportano la crescita di *L. monocytogenes*. Tali condizioni includono un  $\text{pH} \leq 4,4$ ;  $a_w \leq 0,92$ ; una combinazione di  $\text{pH} \leq 5,0$  e  $a_w \leq 0,94$ ;  $\text{NaCl} > 16\%$ . Il congelamento, a  $-18\text{ C}^\circ$  è una condizione estrinseca considerata efficace (CAC, 2009; Commissione europea, 2013). Tuttavia, quando sussista una variabilità nel pH,  $a_w$  o entrambi nel tempo o all'interno del prodotto alimentare, è necessario il controllo della crescita del patogeno nel particolare prodotto. Secondo il Codex (CAC, 2009) per dimostrare che un alimento non supporta la crescita di *L. monocytogenes* è necessario conoscere le caratteristiche intrinseche degli alimenti stessi, i dati relativi allo studio degli alimenti contaminati naturalmente o derivanti dai challenge test, informazioni tratte dalla letteratura scientifica e dalle valutazioni del rischio. Il Laboratorio europeo di riferimento per *L. monocytogenes* (EURL Lm) ha sviluppato linee guida dettagliate per determinare la crescita di *L. monocytogenes* negli alimenti, che includono protocolli per diversi studi sulla durata di conservazione, strumenti di calcolo, esempi e informazioni di base pertinenti. I documenti EURL Lm e della Commissione europea forniscono linee guida sui challenge test (utilizzando alimenti contaminati artificialmente) e sui test di durabilità (utilizzando alimenti contaminati naturalmente) laddove il livello e la prevalenza della contaminazione naturale rendano tali test pertinenti (EURL Lm, 2008).

## LISTERIOSI

La listeriosi è una zoonosi appartenente al gruppo delle malattie trasmesse da alimenti, definita dall'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) come una grave tossinfezione alimentare, relativamente rara e decisamente meno comune rispetto ad altre tossinfezioni alimentari come quelle causate da *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni* o *Salmonella spp.* (Manfreda et al., 2005), ma preoccupante in quanto, pur avendo una bassa prevalenza, presenta tassi di ospedalizzazione (97,1 %) e mortalità (13,0%) piuttosto elevati (EFSA & ECDC, 2021).

Nonostante evidenze della malattia siano state descritte già 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 registrarono i primi focolai epidemici associati al consumo di alimenti contaminati in America e in Europa (Griffiths, 2003).

Attualmente, nell'ambito della sicurezza alimentare l'attenzione nei confronti della malattia e del microrganismo responsabile è fortemente aumentata sia per la sua potenziale gravità sia per la recente comparsa di epidemie di listeriosi.

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 soggetti sottoposti a trattamento con farmaci immunosoppressivi, tra cui quelli utilizzati nelle terapie antitumorali, categorie in costante crescita nei Paesi industrializzati e pazienti sottoposti a trapianto (Schlech, 2000);
- la capacità del microrganismo responsabile di resistere a molteplici condizioni ambientali sfavorevoli, tra cui pH acido, alte concentrazioni di cloruro di sodio, temperature di refrigerazione, presenza di sostanze disinfettanti e altri parametri chimico-fisici che caratterizzano gli alimenti o che sono legati alle tecniche di produzione e conservazione degli stessi (Ferreira et al., 2014);



- la recente e rapida espansione del mercato degli alimenti ready-to-eat e heat-to-eat, cibi pronti al consumo o cibi assemblati e pronti a cottura rapida o dopo un blando riscaldamento (Jiang et al., 2011).

La listeriosi è stata inclusa nella Direttiva CE 2003/99, Allegato I (recepita nell'ordinamento nazionale con il Decreto legislativo n. 191/2006) tra le zoonosi e gli agenti zoonotici che devono essere sottoposti a sorveglianza (Dir. CE 2003/99; D.Lgs. n. 191 del 04/04/06).

### ***Listeria monocytogenes* nell'uomo**

*Listeria monocytogenes* è l'agente eziologico della listeriosi che l'uomo contrae di solito a seguito dell'ingestione di alimenti contaminati, sia di origine animale che vegetale. L'infezione può presentarsi in forma asintomatica oppure sotto forma di setticemia, infezione del sistema nervoso centrale, e listeriosi materno-fetale. La meningite risulta essere la forma clinica più comune negli adulti, a causa del tropismo da parte di *L. monocytogenes* per il sistema nervoso centrale (Schlech, 2000). Da batterio essenzialmente saprofito, che sopravvive fino a 10-12 anni in materiale vegetale in decomposizione, può rivelarsi un pericoloso patogeno intracellulare opportunista, in grado di colpire soggetti debilitati o con deficit del sistema immunitario (Belessi et al., 2011; Nightingale, 2010; Sleator et al., 2009). Tra le fasce di popolazione a rischio, oltre a donne in stato di gravidanza e neonati, rientrano anziani e soggetti sottoposti a trattamento con farmaci immunosoppressivi, tra cui quelli utilizzati nelle terapie antitumorali, categorie in costante crescita nei Paesi industrializzati (Schlech, 2000).

Nei soggetti immunocompetenti, l'infezione si presenta in forma lieve con febbre e/o sintomi gastrointestinali. Di conseguenza, le infezioni sub-cliniche spesso non vengono segnalate e la listeriosi umana viene diagnosticata quasi esclusivamente nelle manifestazioni di setticemia, meningite, meningoencefalite e aborto, rendendo estremamente difficile la stima del reale impatto dell'infezione nella popolazione (Maertens de Noordhout et al., 2014)

Si stima che il 99% di tutti i casi di listeriosi umana sia causato dal consumo di prodotti alimentari contaminati (Mead et al., 1999). Dati europei e internazionali riportano che dei 13 sierotipi di *L. monocytogenes* conosciuti, i sierotipi 1/2a, 1/2b,

1/2c e 4b sono quelli responsabili del 95% delle infezioni umane, con una netta prevalenza del sierotipo 4b soprattutto nei casi di meningoencefalite. I sierotipi 1/2a e 1/2b sono più spesso isolati nei casi di gastroenterite, caratterizzati da periodi di incubazione più brevi e da concentrazioni più elevate di *L. monocytogenes*, come riscontrato nei casi in cui è stata effettuata la ricerca quantitativa dall'alimento (Chen et al., 2017; Lee et al., 2018; Montero et al., 2015). Nonostante non sia definito chiaramente il rapporto dose-risposta nell'uomo, si ritiene che una quantità pari a 100 ufc/g di *L. monocytogenes* al momento dell'assunzione dell'alimento possa essere considerato il valore soglia per il consumatore. A seguito dell'ingestione di alimenti contaminati da un elevato numero di colonie, il microrganismo supera inizialmente le difese locali dell'ospite nel tratto gastrointestinale andando a colonizzare successivamente il sistema reticoloendoteliale a livello del fegato e della milza. Il primo organo in cui ha sede questa colonizzazione è generalmente rappresentato dal fegato. Per mezzo delle internaline il patogeno sollecita la membrana dell'epatocita che lo fagocita al suo interno; la listeriolisina O e le due fosfolipasi intervengono, a questo punto, nella lisi della membrana del fagosoma che favoriscono il rilascio del microrganismo all'interno del citoplasma. Dal citoscheletro dell'epatocita vengono prodotte, a seguito di uno stimolo indotto dalla proteina Act A del batterio, una trama di fibrille contrattili che si dispongono ad un polo del microrganismo; queste sono responsabili della spinta propulsiva del patogeno che determina l'evaginazione della membrana dell'epatocita e favorisce, di conseguenza, la sua penetrazione nella cellula epatica adiacente. In questo modo il microrganismo è in grado di invadere gran parte dell'organo senza mai venire a contatto con i liquidi extracellulari. Questa prima fase della listeriosi decorre in forma subclinica e l'infezione è tenuta sotto controllo da una risposta cellulo-mediata con formazione di granulomi (Fabbi et al., 2005). Il controllo della patologia nel suo stadio iniziale è, quindi, strettamente legato all'integrità della mucosa gastrointestinale ed all'efficienza dei macrofagi a livello epatico, splenico e peritoneale. È stato infatti dimostrato che un danno a livello gastrico dovuto ad una preesistente gastroenterite, l'uso di alcuni medicinali per il trattamento dei tumori maligni e l'utilizzo di agenti immunosoppressivi (corticosteroidi o ciclosporina A), predispongono all'insorgenza di patologie di tipo invasivo. Allo stesso modo l'uso di antiacidi e lassativi può determinare un aumento della suscettibilità individuale nei confronti

della listeriosi: gli antiacidi riducono l'acidità della cavità gastrica consentendo ad un numero maggiore di microrganismi di sopravvivere al passaggio attraverso lo stomaco, i lassativi agiscono, invece, sulla durata del transito intestinale modificandone la microflora (Schuppler et al., 2010).

La sintomatologia della listeriosi è estremamente variabile, in relazione alle caratteristiche di patogenicità del batterio, al livello di contaminazione dell'alimento ed allo stato di salute e di immunocompetenza dell'ospite (McLauchlin et al., 2004). Sono descritte infezioni asintomatiche, manifestazioni gastrointestinali, rare lesioni cutanee, sintomi simil- influenzali, e, nei casi più gravi, aborto, natimortalità, setticemie, meningiti e meningoencefaliti (Fabbi et al., 2005). Tuttavia, le forme più frequenti nell'uomo sono rappresentate da quella invasiva e da quella gastroenterica. La prima interessa principalmente i feti, per il passaggio del microrganismo attraverso la placenta; i neonati, che contraggono l'infezione durante il parto per assunzione attraverso le vie aeree o la via digerente di liquido amniotico o di secrezioni vaginali contaminate; gli anziani ed i soggetti immunodepressi. Nelle donne in gravidanza la listeriosi di solito si presenta come una sindrome simil-influenzale (Manuale Merk, 2001). Le persone immunocompetenti possiedono, nel loro intestino, linfociti attivi che sono per lo più in grado di inattivare il batterio. È probabile, che la maggior parte di noi assuma quasi ogni giorno basse cariche del batterio attraverso gli alimenti, senza conseguenze cliniche. In alcuni casi è possibile si verifichi un'enterite di breve durata, che in genere non viene correlata alla presenza del microrganismo nell'alimento. Non è stata accertata una correlazione tra differenti ceppi di *L. monocytogenes* e particolari forme cliniche dell'uomo, pertanto qualunque ceppo di *L. monocytogenes* potrebbe essere responsabile di tutte le diverse forme cliniche di listeriosi (Rocourt et al., 1996).

### ***Listeria monocytogenes* negli animali**

Gli animali più sensibili alla listeriosi sono nell'ordine: le pecore, i bovini, le capre, i suini, i volatili (polli, anatre, piccioni), il cavallo, il cane ed il gatto. I diversi ceppi non sono ospite-specifici e sono in grado di provocare differenti quadri di malattia. Tra le specie appartenenti al genere *Listeria*, *L. monocytogenes* è considerata patogena sia per gli esseri umani sia per diverse specie animali, mentre *L. ivanovii* è un patogeno soprattutto per i ruminanti e occasionalmente per l'uomo

(McLauchlin & Martin, 2008). Le pecore possono essere gravemente colpite dalla listeriosi e i segni includono encefalite, aborto nell'ultimo trimestre (da 12 settimane in poi) e gastroenterite con setticemia (Rawool et al., 2007; OIE 2014). La forma setticemica colpisce principalmente i giovani agnelli (sotto le 5 settimane di età) mentre la forma encefalica è più frequente negli agnelli più anziani (4-8 mesi). La morte si verifica in 2-3 giorni a causa di insufficienza respiratoria. Capre e bovini mostrano segni simili a quelli delle pecore anche se nei bovini, il decorso della malattia è lungo e richiede circa 1-2 settimane (OIE 2014).

La patologia si verifica prevalentemente a seguito dell'ingestione di insilati contaminati e la patogenesi è analoga a quella dell'uomo. Nonostante generalmente la malattia decorra nella maggior parte degli animali in maniera asintomatica, le principali forme cliniche sono rappresentate da: una forma setticemica, una nervosa, ed una genitale (aborto). In caso di focolaio in genere prevale un unico quadro sintomatologico. I ruminanti sono gli animali che manifestano con maggior frequenza le forme cliniche, mentre, negli altri animali i sintomi sono rari con prevalenza di forme nervose o setticemiche nei carnivori, aborti o morte improvvisa nei conigli, setticemie nei suinetti e negli uccelli. Le forme nervose interessano in particolar modo i bovini (1-3 anni), nei quali si manifestano con la comparsa di micro-ascessi nel tronco cerebrale, mielite spinale, cuffia linfocitica perivascolare, vasculite, edema ed emorragie (Rahimi et al., 2013). Negli equini prevale invece la forma meningo-encefalica, mentre nei suini, che raramente contraggono la malattia, e nei volatili si verifica generalmente setticemia seguita da sintomi di natura nervosa (Manuale Merk, 2001).

Per quanto riguarda la distribuzione per sierotipo, la meningite nei bovini è causata nella grande maggioranza dei casi dal tipo 4 b, infatti, da un'analisi del contenuto dello stomaco dei feti abortiti si è riscontrato un numero uguale di isolamenti sia di tipo 1 che 4 b, che insieme sono ritenuti responsabili del 98% di tutte le infezioni da *Listeria* nel mondo (Kampelmacher et al., 1980).

### ***Listeria monocytogenes* nell'ambiente**

*Listeria monocytogenes* è un microrganismo ubiquitario, estremamente diffuso nell'ambiente; si rinviene nelle acque, nel suolo, nei vegetali, in particolare in quelli in avanzato stato di decomposizione, nel pulviscolo atmosferico e talvolta

nell'intestino e nel tratto genitale dell'uomo e degli animali, dove, spesso, non determina alcuna patologia (Welshimer, 1968). *L. monocytogenes* è anche un residente transitorio del tratto intestinale negli esseri umani, infatti, una piccola percentuale di persone, dal 2 al 10% della popolazione generale, risulta essere portatore del microrganismo senza apparenti conseguenze per la salute (McLauchlin, et al., 2004).

La presenza del microrganismo nell'ambiente può essere correlata ad un ciclo di arricchimento oro-fecale da parte dei ruminanti domestici. La presenza tellurica di *L. monocytogenes* e altri agenti patogeni di origine alimentare solleva problemi di salute nei campi coltivati e nei pascoli poiché il suolo può essere un vettore di agenti patogeni per le piante coltivate e gli animali d'allevamento. L'insilamento di colture contaminate può comportare l'aumento delle popolazioni di *L. monocytogenes* nel mangime finale che può diventare il vettore della listeriosi bovina (Wiedmann et al., 1996).

Il riciclaggio agricolo dei rifiuti organici e il loro uso come fertilizzante senza un'adeguata procedura igienico-sanitaria può facilitarne il trasferimento di *L. monocytogenes* al suolo (Garrec et al., 2003). La presenza di *L. monocytogenes* è stata infatti individuata nelle feci degli animali da allevamento con una frequenza di rilevamento che dal 22 al 33% negli allevamenti bovini e dal 3 al 18% negli allevamenti caprini e ovini (Nightingale et al., 2004). La sopravvivenza durante lo stoccaggio dei rifiuti fecali è limitata a poche settimane, ma gli input giornalieri negli impianti di stoccaggio sono tali da mantenere un carico costante di *L. monocytogenes* vitale (Hutchison et al., 2005).

All'interno degli allevamenti le listerie si riscontrano nelle lettiere, nelle mangiatoie e nelle pareti delle stalle; possono infatti sopravvivere 21 mesi nel latte infetto, da 1 a 18 anni nelle feci, 1 o 2 anni nel suolo e possono essere isolate dopo 4 settimane in campioni di mais, segale, trifoglio, acque superficiali ed acque reflue. La presenza delle listerie sia nell'ambiente naturale che agro - zootecnico è quindi responsabile della contaminazione degli impianti di produzione e delle materie prime di origine animale e vegetale utilizzate per la produzione di alimenti (Kampelmacher et al., 1980). La sopravvivenza del patogeno nell'ambiente sembrerebbe influenzata dall'umidità, dal tipo di terreno e dall'esposizione ai raggi solari, nonostante il microrganismo sia comunque molto resistente agli stress ambientali. Gli incrementi dei casi di listeriosi animale nel periodo invernale ed in

quello primaverile sono da correlarsi spesso alla scarsa disponibilità di insilati ed alle abbondanti piogge che, a causa dell'elevata umidità, ne rendono sfavorevole una corretta conservazione. Inoltre, tra i fattori che favoriscono la diffusione del microrganismo si ricorda uno scarso o inadeguato trattamento del materiale abortivo, l'ingresso in allevamento di animali asintomatici, il mancato isolamento dei casi clinici e lo scarso controllo dei roditori (Nightingale et al., 2004).

Nell'ambiente casalingo, invece, questo patogeno è stato spesso rinvenuto all'interno dei frigoriferi; in uno studio riportato dal CDC la *Listeria spp.* è stata riscontrata nel 64 % dei 123 frigoriferi esaminati che dovrebbero, per questo, essere regolarmente sottoposti ad un adeguata attività di pulizia e sanificazione, considerata soprattutto l'attitudine alla formazione di biofilm che rende il patogeno resistente al trattamento con i comuni sanizzanti (Marriott et al., 2008). Diversi sono infatti gli studi in cui è stata valutata l'efficacia di prodotti comunemente utilizzati per la sanitizzazione e la disinfezione delle superfici nei confronti della *L. monocytogenes*; in generale, il patogeno è risultato sensibile in vitro ai composti acidi, agli iodofori, ai composti a base di cloro ed ai sali di ammonio quaternario (Van de Weyer et al., 1993). Tuttavia, il mancato rispetto delle buone pratiche di igiene e di lavorazione viene considerato una delle principali modalità di trasmissione del patogeno, così come la contaminazione domestica di alimenti cotti o pronti per il consumo è favorita dall'uso di utensili da cucina che vengono utilizzati su cibi contaminati e successivamente su cibi indenni da contaminazione (AFSSA, 2000).

### **Listeria e resistenza agli antibiotici**

Col termine "resistenza antimicrobica" si intende la capacità di un microrganismo di resistere a concentrazioni di un determinato antimicrobico tali da inibire o uccidere microrganismi della stessa specie. La resistenza può essere "intrinseca", ovvero propria del patogeno, o "acquisita" dallo stesso attraverso il trasferimento orizzontale di geni esogeni provenienti da altri batteri o per mezzo di una mutazione genetica. Quando, invece, l'agente patogeno manifesta resistenza nei confronti di differenti classi di antimicrobici, si parla di "resistenza multipla" (EFSA, 2008).

Negli ultimi decenni la resistenza agli antibiotici, ed in particolare la multi-resistenza, viene considerata a livello mondiale un problema per la salute pubblica.

La causa è da ricercarsi in un maggior impiego o nell'uso improprio degli antibiotici per la cura delle malattie in medicina umana e veterinaria e nella diffusione, spesso attraverso la catena alimentare, di ceppi resistenti. Risulta pertanto fondamentale sia un adeguato monitoraggio dei patogeni resistenti, isolati dai prodotti alimentari e da ambienti di lavorazione, sia la ricerca di strategie che limitino la loro diffusione (Fallah et al., 2013).

Al momento non esiste un vaccino disponibile in commercio per prevenire la listeriosi; quindi, la diagnosi precoce è fondamentale per il successo del trattamento antibiotico, specialmente per i pazienti ad alto rischio (Calderón-González et al., 2014). Un problema che complica le indagini sui grandi focolai di listeriosi è che il lungo tempo di incubazione di *L. monocytogenes*, che può raggiungere fino a 70 giorni dopo il consumo di alimenti contaminati, rende difficile rintracciare l'agente patogeno alla sua origine in quanto i pazienti hanno difficoltà a ricordare cosa hanno mangiato dopo lunghi periodi (Olaimat et al., 2018).

La terapia primaria per la listeriosi umana è rappresentata da una combinazione di antimicrobici quali l'Ampicillina o Amoxicillina e Gentamicina (Walsh et al., 2001), mentre la Vancomicina, l'associazione Trimetoprim ed un Sulfonamide (Sulfametossazolo) e l'Eritromicina vengono utilizzati come farmaci di seconda scelta nel trattamento di donne in gravidanza e nei pazienti allergici ai  $\beta$ -lattamici (Abdollahzadeh et al., 2016). La maggior parte degli antimicrobici impiegati per il trattamento delle malattie degli animali appartengono alle stesse classi di farmaci utilizzati in medicina umana (EFSA 2008).

In generale, la maggior parte della *Listeria spp.* isolata da campioni alimentari, clinici e ambientali è sensibile alla terapia antibiotica normalmente utilizzata che viene applicata contro i batteri Gram-positivi tra cui tetracicline, ampicillina, penicillina G, imipenem, amoxicillina, sulfonamidi, aminoglicosidi, macrolidi, cloramfenicolo e glicopeptidi (Olaimat et al., 2018). Quasi tutti i ceppi di *L. monocytogenes* sono suscettibili alla maggior parte degli antibiotici comunemente utilizzati nella cura della listeriosi, tuttavia, spesso questo patogeno mostra una naturale resistenza ai Fluorochinoloni ed alle Cefalosporine attuali, in particolare quelle di terza e quarta generazione (Cefotaxime e Cefepime), ed alla Fosfomicina, Oxacillina ed i Licosamidi. Per questo, solo circa il 70% dei soggetti guarisce a seguito del trattamento (Gomez et al., 2014).

La resistenza agli antibiotici è considerata una delle principali minacce alla salute pubblica globale, alla sicurezza alimentare e allo sviluppo alimentare poiché rende le malattie più difficili da trattare in conseguenza all'inefficacia degli antibiotici, il che può aumentare il tasso di mortalità, il periodo di ospedalizzazione e il costo delle spese sanitarie (OMS, 2018). I microrganismi, in particolare i batteri, rispondono in modo diverso agli antibiotici e ad altri composti antimicrobici, sia a causa di differenze intrinseche sia a causa dello sviluppo di resistenza per adattamento o scambio genetico (Olaimat et al., 2018).

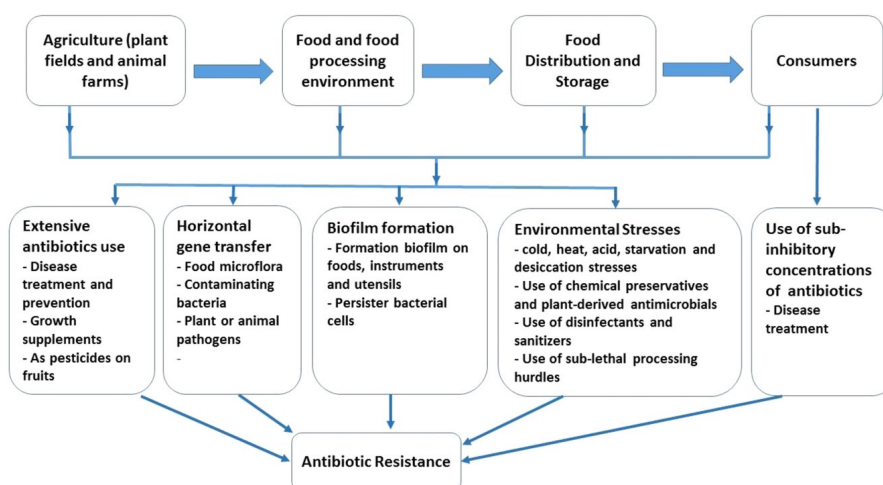
La resistenza antimicrobica sviluppata da numerosi ceppi di *L. monocytogenes* è legata a diversi meccanismi messi in atto dal batterio quali, ad esempio, la riduzione della permeabilità della membrana cellulare, la modifica del target batterico, la produzione da parte del microrganismo di enzimi inattivanti l'antibiotico e la fuoriuscita del farmaco stesso dalla cellula batterica per mezzo di un sistema di pompe attive (Bae et al., 2014). È stata, inoltre, spesso osservata tra le due specie di *Listeria*, *L. monocytogenes* e *L. innocua*, una resistenza antibatterica acquisita attraverso modificazioni genetiche esogene, regolate da plasmidi e trasposoni. Il passaggio di informazioni genetiche tra le due specie, comunemente riscontrate all'interno dello stesso alimento o ambiente di lavorazione, è stato dimostrato *in vitro* per gli antibiotici quali la Streptomina, Eritromicina ed il Cloramfenicolo (Yucel et al., 2005).

Visto il gran numero di microrganismi resistenti presenti negli ambienti di lavorazione, anche la *Listeria spp.*, precedentemente sensibile a tutti gli agenti antimicrobici, ha, infatti, subito nel corso degli anni numerosi cambiamenti (Walsh et al., 2001). È noto che la contaminazione in tali ambienti può essere ridotta mantenendo l'igiene e controllando tutte le fasi di produzione in modo da limitare la colonizzazione, la trasmissione, la contaminazione crociata e la produzione di biofilm (Thakur et al., 2018). Tuttavia, Buchanan et al. (2017) hanno rilevato una possibile tolleranza di *Listeria monocytogenes* verso i disinfettanti con ammonio quaternario, acquisita dal batterio grazie a nuovi geni prodotti o derivanti da mutazioni di geni esistenti. Questo fatto ha determinato una maggior presenza di *Listeria monocytogenes* dovuta al fatto che i conservanti più usati in commercio esercitano un effetto antilisterico lieve o moderato che ha effetto batteriostatico piuttosto che battericida. Inoltre, gli antimicrobici possono ridurre la competitività



della flora naturalmente presente, migliorando indirettamente il potenziale di crescita di *L. monocytogenes* (EFSA, 2018).

Negli ultimi decenni, l'uso estensivo di antibiotici ha talvolta comportato l'abuso di questi farmaci nell'uomo e negli animali, contribuendo notevolmente alla progressione e alla diffusione della resistenza agli antibiotici tra i patogeni di origine alimentare tra cui *L. monocytogenes* (Wilson et al., 2018). Si ritiene che la resistenza agli antibiotici si sviluppi nei batteri in diversi modi. Alcuni agenti patogeni di origine alimentare sono intrinsecamente resistenti a determinati antibiotici e questo è correlato alla loro fisiologia generale, mentre altri agenti patogeni sviluppano resistenza agli antibiotici per mutazione o altri tipi di alterazione genetica, spesso in risposta agli stress ambientali cui sono sottoposti (Munita & Arias, 2016). (Figura 4).



Comp Rev Food Sci Food Safe, Volume: 17, Issue: 5, Pages: 1277-1292, First published: 09 August 2018, DOI: (10.1111/1541-4337.12387)

Figura 4 Catena alimentare e fattori agricoli che influenzano la resistenza agli antibiotici tra gli isolati alimentari di *L. monocytogenes*.

Gli antibiotici sono ampiamente utilizzati per prevenire, controllare e curare le malattie e migliorare la crescita degli animali in molti Paesi (Economou & Gousia, 2015; Lungu et al., 2011; Wilson et al., 2018). In Europa, gli antibiotici sono stati usati come additivo per mangimi animali dagli anni Cinquanta del secolo scorso; tuttavia, il loro uso come additivi per mangimi è stato vietato dall'Unione europea

dal gennaio 2006 (Castanon, 2007). Sebbene esistano diversi modi possibili in cui i ceppi resistenti agli antibiotici possono essere trasferiti tra animali ed esseri umani, il modo più probabile è la trasmissione attraverso la catena alimentare. *L. monocytogenes* incontra comunemente bassi livelli di antibiotici e altri antimicrobici nella catena di produzione alimentare. Questo può servire come adattamento pre-esposizione, che successivamente consente a *L. monocytogenes* di resistere a livelli più elevati di antibiotici o farmaci antimicrobici (Lungu et al., 2011).

### **Listeria spp. e *Listeria monocytogenes* negli alimenti**

Il 99% circa di casi di listeriosi nell'uomo è legato al consumo di alimenti contaminati (Nightingale, 2010). *Listeria monocytogenes* è un contaminante comune di una vasta gamma di prodotti alimentari, tra cui verdure crude, latte crudo, carne cruda, formaggio a pasta molle, pesce e pollame. Gli alimenti minimamente trasformati e pronti al consumo (RTE) sono le principali fonti di contaminazione in quanto l'agente patogeno è altamente tollerante agli effetti dannosi della lavorazione, come il congelamento, l'essiccazione e il riscaldamento. *L. monocytogenes* è anche in grado di colonizzare le superfici inerti degli impianti di trasformazione alimentare per formare biofilm (Thakur et al., 2018).

Nonostante siano stati riscontrati focolai di malattia associati al consumo di diversi prodotti alimentari quali meloni, formaggi, insalate confezionate, mele caramellate preconfezionate e gelati (CDC, 2015), un'indagine condotta in Europa nel 2014 ha confermato che la maggiore prevalenza di campioni positivi per *L. monocytogenes* si riscontra nei prodotti ittici RTE (soprattutto pesce affumicato) con una percentuale del 10,6% degli 11.324 campioni testati, seguiti dai RTE a base di carne suina (2,3% su 45.475 campioni) e dai formaggi molli o semi-molli (1,0% delle 2.505 unità testate); la causa è da ricercarsi nel lungo periodo di conservazione di questi alimenti, che favorisce la proliferazione batterica, e nel consumo degli stessi senza un'ulteriore cottura (EFSA, 2015).

La contaminazione da parte del microrganismo può avvenire nei diversi momenti del ciclo produttivo; tra i fattori predisponenti, si ricordano: l'impiego di materie prime contaminate in un processo tecnologico che non prevede la presenza di ostacoli efficaci, la cross-contaminazione dei prodotti finiti per il contatto con le

materie prime, la presenza di superfici contaminate ed il mancato rispetto delle buone pratiche di igiene e di lavorazione da parte dell'OSA (Chasseignaux et al., 2001).

### **Cibi pronti al consumo (Ready-to-eat foods RTE)**

Il comitato scientifico delle misure veterinarie relative alla sanità pubblica (SCVPH) nel 1999 ha pubblicato dati a sostegno dell'idea che *L. monocytogenes* potesse contaminare quasi tutte le categorie di alimenti. L'infezione da *Listeria* è associata a prodotti a base di carne (Selby et al., 2006), latticini (Leite et al., 2005), prodotti ittici (Jallewar et al., 2007) e verdure (Crepet et al., 2007).

Negli ultimi anni molte categorie di alimenti sono state collegate alla listeriosi; tuttavia, la maggior parte dei casi era dovuta al consumo di RTE (Garrido et al., 2010; Uyttendaele et al., 2009). Gli alimenti RTE sono definiti dal Regolamento CE n. 2073/2005 come: *prodotti destinati dal produttore al consumo diretto da parte dell'uomo senza la necessità di un trattamento termico come la cottura che eliminerà o ridurrà a livelli accettabili i microrganismi che destano preoccupazione*. Alcuni esempi di alimenti RTE includono: formaggi a pasta molle come ricotta, brie, feta, erborinati (ad esempio Gorgonzola) e formaggi a pasta molle in stile messicano come il queso fresco; hot dog, preparati a base di carne, salumi; panini; paté/creme spalmabili; prodotti ittici affumicati refrigerati come il salmone affumicato; insalate di gastronomia come coleslaw, maccheroni, tonno; verdure crude preconfezionate, insalata mista di verdure crude e frutta fresca pretagliata. L'applicazione del trattamento termico durante la lavorazione degli alimenti può ridurre il rischio di contaminazione da *L. monocytogenes* nel prodotto finito, tuttavia può verificarsi, la ricontaminazione di alimenti RTE cotti durante le fasi di post-elaborazione (Zhu et al., 2005). Dopo la ricontaminazione, in presenza di condizioni favorevoli, *Listeria* può moltiplicarsi nel prodotto raggiungendo livelli che rappresentano un potenziale rischio per la salute umana (EFSA & ECDC, 2013).

Un'indagine sulla prevalenza di *L. monocytogenes* in RTE alla fine della loro shelf-life dai mercati al dettaglio, condotta dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) nel periodo 2010-2011 in 26 Stati membri dell'UE, ha mostrato una prevalenza di contaminazione del 10,3% nei prodotti della pesca, del 2,07% nei

prodotti a base di carne e dello 0,47% nei campioni di formaggio. Il tasso di campioni che superano il limite di sicurezza alimentare di 100 ufc/g imposto dalla Commissione europea è stato rispettivamente dell'1,7 %, dello 0,43 % e dello 0,06 % per i prodotti della pesca, per i campioni di carne cotta e di formaggi a pasta molle e semi molle. Sebbene il tasso di campioni superiori a 100 ufc/g fosse molto basso, essi rappresentano ancora una seria preoccupazione per la salute pubblica a causa della grande distribuzione di tali prodotti sul mercato (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), et al., 2018). I dati EFSA riportano che la maggior parte dei casi di listeriosi invasiva è causata all'ingestione di alimenti RTE con più di 2000 ufc/g e un terzo dei casi è dovuto alla crescita del microrganismo durante la fase di conservazione a livello del consumatore (EFSA, 2019)

### **Criteri internazionali di sicurezza alimentare microbiologica per *Listeria monocytogenes***

Nell'Unione europea i criteri microbiologici di sicurezza alimentare relativi a *L. monocytogenes* sono previsti dal regolamento (CE) n. 2073/2005, del 15 novembre 2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. I criteri microbiologici definiscono l'accettabilità dei prodotti alimentari immessi sul mercato; se i criteri non sono soddisfatti, i prodotti devono essere ritirati o richiamati.

Ai sensi dell'articolo 4 del regolamento (CE) n. 852/2004, gli operatori del settore alimentare sono responsabili del rispetto dei criteri microbiologici. I criteri di sicurezza alimentare per *L. monocytogenes* sono indicati nell'allegato I del regolamento, dove sono indicati anche la categoria di alimenti, il piano di campionamento, i limiti microbiologici, i metodi analitici e la fase in cui devono essere applicati i criteri microbiologici di sicurezza alimentare.

Gli alimenti pronti al consumo (RTE) sono la categoria alimentare che dovrebbe essere testata per *L. monocytogenes* come indicato nell'allegato. Tra gli alimenti RTE il regolamento si distingue in tre categorie:

1. Alimenti RTE destinati ai lattanti e alimenti pronti al consumo a fini medici speciali: i criteri si applicano ai prodotti immessi sul mercato durante la loro shelf-life e contemplano l'assenza in 25 g ( $n = 10$ ,  $c = 0$ ; dove  $n$  = numero

di unità che compongono il campione;  $c$  = numero di unità campione che danno valori compresi tra  $m$  e  $M$ ). Il metodo di analisi di riferimento indicato dal Regolamento è la EN/ISO 11290-1.

2. Alimenti RTE in grado di supportare la crescita di *L. monocytogenes*, diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali: per i prodotti immessi sul mercato durante la loro shelf-life è previsto un limite di 100 ufc/g ( $n = 5$ ,  $c = 0$ ), se il fabbricante è in grado di dimostrare che il prodotto non supererà il limite di 100 ufc/g per tutta la shelf-life. L'operatore può fissare durante il processo limiti intermedi che dovrebbero essere sufficientemente bassi da garantire che il limite di 100 ufc/g non venga superato alla fine del periodo di validità. Il metodo di analisi di riferimento indicato dal Regolamento è la EN/ISO 11290-2. Prima che i prodotti abbiano lasciato il controllo immediato dell'operatore del settore alimentare quando non è possibile fornire prove che dimostrino che il prodotto non supererà il limite di 100 ufc/g per tutta la durata di conservazione, si applicano i criteri di assenza in 25 g ( $n = 5$ ,  $c = 0$ ). Il metodo di analisi di riferimento indicato dal Regolamento è la EN/ISO 11290-1.
3. Alimenti pronti al consumo che non sono in grado di sostenere la crescita di *L. monocytogenes*, diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali: gli alimenti di questa categoria comprendono i prodotti con  $\text{pH} \leq 4.4$  o  $a_w \leq 0.92$ , o  $\text{pH} \leq 5.0$  e  $a_w \leq 0.94$  e quelli con una shelf-life inferiore a 5 giorni. Se vengono immessi sul mercato durante la loro shelf-life viene fissato un limite di 100 ufc/g ( $n = 5$ ,  $c = 0$ ). Per questi prodotti, immessi sul mercato durante la loro shelf-life è previsto un limite di 100 ufc/g ( $n = 5$ ,  $c = 0$ ). Il metodo di analisi di riferimento è la EN / ISO 11290-2.

### ***Listeria monocytogenes* nel settore lattiero-caseario**

*L. monocytogenes* è un contaminante frequente negli ambienti lattiero-caseari in cui i ruminanti svolgono un ruolo importante nel suo mantenimento (Mohammed et al., 2009; Nightingale et al., 2004; Pradhan et al., 2009). L'insilato di scarsa qualità è comunemente contaminato da *L. monocytogenes* e i ruminanti possono trasmettere l'agente patogeno, sia come portatori asintomatici sia versandolo nel loro latte come conseguenza della mastite clinica o subclinica (Linton et al., 2008; Pintado, Ferreira, & Sousa, 2009). Il latte crudo può essere contaminato da *L. monocytogenes*

dall'utilizzo di attrezzature sporche durante la mungitura, durante lo stoccaggio in serbatoi alla rinfusa o nel trasporto all'impianto di lavorazione del formaggio, dove le misure di controllo igienico- sanitarie potrebbero non essere adeguate (Almeida et al., 2013; Parisi et al., 2013). L'incidenza di *L. monocytogenes* nel latte crudo varia dallo 0,4 al 16% e sono differenti i fattori alla base di tale variabilità, tra cui diversi siti geografici, la stagione di campionamento, i metodi di rilevamento, le dimensioni dell'azienda e le azioni di gestione. Precedenti indagini hanno dimostrato che le fonti di contaminazione del formaggio sono il latte crudo, il latte pastorizzato in modo inadeguato o la contaminazione post-pastorizzazione con organismi originariamente derivati da latte crudo o dagli ambienti di produzione (Lomonaco et al., 2009).

Il latte crudo contaminato da *L. monocytogenes* e introdotto in un impianto di trasformazione lattiero-casearia rappresenta un rischio per la salute umana se utilizzato per la produzione di formaggio non sottoposto a pastorizzazione (Kousta et al., 2010).

Il latte e i prodotti lattiero-caseari sono ampiamente consumati in Europa (circa 132 kg a persona all'anno) e sono consumati da tutte le categorie di persone, compresi i gruppi ad alto rischio (Commissione europea, 2000); tali prodotti sono stati implicati in circa la metà di tutti i casi di focolai e in gran parte dei casi sporadici di listeriosi (Lunden et al., 2004). La maggior parte dei casi sono legati al consumo di latte crudo e prodotti a base di latte non pastorizzato, ma casi di listeriosi si sono verificati anche in seguito all'ingestione di latticini ottenuti da latte pastorizzato come conseguenza della contaminazione post-processo (CDC, 2008; Fleming et al., 1985).

La sopravvivenza e la crescita di *L. monocytogenes* nel formaggio dipendono principalmente dalle condizioni di produzione, maturazione e conservazione. Inoltre, tra i parametri tecnologici che possono influenzare il comportamento di *L. monocytogenes* nel formaggio ci sono la natura e l'attività delle colture starter, la velocità e l'entità dell'acidificazione e della salatura, nonché il contenuto di umidità e la temperatura (Gnanou et al., 2000). Il formaggio a pasta molle è un prodotto caratterizzato da un valore di pH, che va da 4,5 a 6,5, e da un contenuto finale di NaCl dal 2,3% al 3,5% p/p (Pintado, et al., 2005). Queste caratteristiche sono considerate favorevoli per la conservazione degli alimenti, ma per *L. monocytogenes* rappresentano condizioni subletali che possono indurre tolleranza

a condizioni di pH e sale più estremi (Skandamis et al., 2012). Pertanto, i metodi tradizionali di conservazione del formaggio potrebbero non solo non riuscire a prevenire la sopravvivenza del patogeno, ma potrebbero persino migliorarne la sopravvivenza e la virulenza. Infatti, la contaminazione con *L. monocytogenes* può verificarsi in diverse fasi della produzione di formaggio e derivare da più fonti, tra cui salamoia, scarichi, pavimento, materiale di imballaggio, scaffali, coltello da taglio per cagliata, spazzole e refrigeratori (Parisi et al., 2013). Ad esempio, nel processo di maturazione del formaggio, le soluzioni di salamoia possono essere contaminate da *L. monocytogenes* che può sopravvivere da 7 giorni a oltre 259 giorni, il che rende questo un potenziale serbatoio per il patogeno; inoltre, la capacità del microrganismo di aderire a superfici alimentari e non alimentari e persistere al di fuori del prodotto, sulle attrezzature e nelle strutture di stoccaggio, facilita la sua sopravvivenza e replicazione negli ambienti di lavorazione post-pastorizzazione, anche grazie alla sua capacità di formare biofilm. (Latorre et al., 2010, 2011).

L'incidenza riportata di *L. monocytogenes* in ambienti di lavorazione lattiero-casearia in diversi Paesi è molto variabile, compresa tra lo 0 e il 52%. Questa ampia variabilità può essere una conseguenza delle dimensioni dell'impianto di lavorazione del formaggio, della variazione delle operazioni di produzione e del rispetto delle buone pratiche di fabbricazione. Un'alta frequenza di campioni ambientali positivi per *L. monocytogenes* è stata associata all'uso di una scarsa progettazione sanitaria del processo di produzione del formaggio e di una carente igiene personale (Almeida et al., 2013).

La significativa prevalenza del patogeno negli impianti di lavorazione del formaggio mostra il potenziale dei prodotti lattiero-caseari e degli ambienti lattiero-caseari per la sopravvivenza di questo microrganismo. La sua eradicazione dagli impianti di produzione non è un'operazione facile e spesso si osserva la persistenza del microrganismo anche dopo l'attuazione di misure di controllo, suggerendo l'esistenza di particolari siti di colonizzazione che devono essere identificati per poter intraprendere adeguate azioni di disinfezione / igiene (Lomonaco et al., 2009). Tali dati sottolineano l'importanza di attuare lavorazioni in conformità con le Buone Pratiche di Fabbricazione osservando i principi del Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) in modo da ottenere il controllo dell'agente patogeno

durante tutto il processo di produzione e trasformazione del formaggio (Almeida et al., 2013; Lomonaco et al., 2009; Parisi et al., 2013).

## **Latte**

La diffusione di *L. monocytogenes* con latte di ruminanti da latte infetti è considerato un risultato raro. Lo stato sanitario degli animali colpiti (encefalite, aborti, mastite) di solito li rende inadatti alla mungitura. Sono stati riportati livelli del microrganismo fino a  $10^4$  ufc/ml nel latte di animali infetti; in alcune circostanze il microrganismo può essere eliminato attraverso il latte da animali sani per diversi mesi rappresentando una grande preoccupazione per la salute pubblica (Ryser, 2011). La pastorizzazione applicata al latte alimentare, che è diventata una pratica di routine negli Stati Uniti e in Europa dal 1950 garantisce la distruzione totale di *L. monocytogenes*. La contaminazione del latte crudo con *L. monocytogenes* è raramente dovuta alla mastite o alla contaminazione fecale, ma è generalmente causata da contaminanti ambientali come i mangimi, ad esempio insilato, (Vazquez-Boland et al, 2001) e acqua potabile fornita agli animali dove il batterio può proliferare (Venegas et al., 2004).

A causa della natura onnipresente di *L. monocytogenes*, il patogeno può essere trovato in ambienti naturali e urbani; tuttavia, sembra essere considerevolmente più frequentemente isolato dagli ambienti agricoli (Sauders et al., 2007). I ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati dal latte crudo appartengono ai sierotipi 1/2a, 1/2b, 4b, 3b e 4c (Van Kessel et al., 2004).

## ***Listeria monocytogenes* nei prodotti lattiero-caseari**

*Listeria monocytogenes* nei prodotti lattiero-caseari presenta raramente un livello superiore a 100 ufc/g (EFSA, 2010), tuttavia tali prodotti sono stati collegati a diversi casi di epidemie di listeriosi segnalate in tutto il mondo (Almeida et al., 2013), rappresentando il 35% di tutti i focolai di *Listeria monocytogenes* (FDA, 2003). Per questo motivo i formaggi sono inclusi nel rapporto della FDA Top Ten sugli alimenti più rischiosi (Center for Science in the Public Interest, CSPI, 2009). La composizione del formaggio, il contenuto di umidità, il pH, il contenuto di sale e le condizioni di maturazione influenzano la presenza e la crescita di *L.*



*monocytogenes* (D'Amico, Druart, & Donnelly, 2008; Morgan et al., 2001; Ryser, 1999). I formaggi a pasta molle in particolare possono sostenere la sopravvivenza e la riproduzione di questo patogeno (Gay & Amgar, 2005; Morgan et al., 2001; Rogga et al., 2005; Ryser, 1999). L'EFSA rileva anche una maggiore prevalenza di *L. monocytogenes* nei formaggi a pasta molle e semi molle, in particolare quelli a base di latte pastorizzato (EFSA & ECDC, 2009, 2011). Infatti, il rischio di contaminazione da *L. monocytogenes* potrebbe coinvolgere sia i formaggi a latte crudo che quelli prodotti con latte pastorizzato e microfiltrato perché la contaminazione post-processo è ugualmente possibile in questi prodotti (Rudolf & Scherer, 2001).

La composizione ricca di nutrienti del formaggio, il contenuto di umidità e di sale che possono essere molto variabili, il pH e le condizioni di maturazione influenzano, generalmente favorendo, la presenza e la crescita di *Listeria monocytogenes* come riscontrato anche dallo studio di Melo et al. (2015). Infatti, i formaggi a pasta molle sono spesso associati a focolai di listeriosi grazie alle loro caratteristiche intrinseche come pH sufficientemente alto (5,0-6,3), elevata attività dell'acqua ( $a_w > 0,97$ ), alta umidità (55-58% e più) e bassa quantità di sale (1,4-1,6%) (Campagnollo et al., 2018).

Al contrario, i formaggi lattici fermentati sembrano essere meno favorevoli per la contaminazione del microrganismo poiché durante la produzione la combinazione di diversi fattori, tra i quali la competizione con la coltura di avviamento, la bassa attività dell'acqua e un basso pH, ostacolano la sopravvivenza e la crescita di *L. monocytogenes* (Morgan et al., 2001).

## **BATTERIOCINE**

Negli ultimi anni, i consumatori sono sempre più consapevoli del rischio per la salute umana rappresentato dall'uso di conservanti chimici negli alimenti. Al contrario, la crescente domanda da parte dell'industria lattiero-casearia di prolungare la durata di conservazione e prevenire il deterioramento dei prodotti lattiero-caseari è un appello per la ricerca di nuovi conservanti e nuovi metodi di conservazione.

Il termine batteriocina fu utilizzato per la prima volta negli anni '50 da Francois Jacob per indicare composti proteici di origine batterica, prodotti indifferentemente da batteri Gram-positivi e Gram-negativi, dotati di attività inibitoria nei confronti di ceppi batterici differenti dal ceppo produttore, ma ad esso strettamente correlati. Caratteristica comune di questa eterogenea famiglia di sostanze è di essere proteine, generalmente non ad ampio spettro battericida, estremamente stabili e resistenti (Jacob et al., 1953).

La prima batteriocina è stata scoperta da Gratia (1925) come una proteina antibatterica prodotta da *Escherichia coli*, tale sostanza è stata chiamata colina. Il ricercatore André Gratia nel 1925 osservò la capacità di un ceppo virulento di *Escherichia coli*, in infezioni sperimentali, di produrre una sostanza stabile alle oscillazioni di temperatura e in grado di sviluppare attività inibitoria nei confronti di altri ceppi di *E. coli*. Dal momento che la sostanza era in grado di uccidere *E. coli*, venne denominata "colicina" (Gratia, 1925).

Le batteriocine sono peptidi antimicrobici, considerati sicuri poiché possono essere facilmente degradati da enzimi proteolitici del tratto gastrointestinale dei mammiferi (Mills et al., 2011). Inoltre, la maggior parte dei produttori di batteriocine appartiene ai batteri lattici (LAB), un gruppo che si trova naturalmente negli alimenti e ha una lunga storia di uso sicuro nell'industria lattiero-casearia. Poiché non rappresentano un problema dal punto di vista del rischio per la salute umana, le batteriocine, purificate o escrete dai ceppi produttori, sono un'ottima alternativa all'uso di conservanti chimici nei prodotti lattiero-caseari (Cotter et al., 2005). Queste possono essere utilizzate nei latticini tal quali, più o meno purificate, oppure i batteri lattici produttori di batteriocine possono essere utilizzati come coltura adiuvante come parte del processo di fermentazione. Sono già note una serie di applicazioni delle batteriocine e dei LAB produttori di batteriocine per il controllo degli agenti patogeni nel latte, nello yogurt e nei formaggi. Una delle tendenze più recenti consiste nell'incorporazione delle batteriocine, direttamente come forma purificata o semipurificata o nell'incorporazione di LAB produttori di batteriocine in pellicole e rivestimenti bioattivi, applicati direttamente sulle superfici e sugli imballaggi alimentari in grado di ridurre il deterioramento microbiologico e migliorare la sicurezza dei latticini (Cotter et al., 2005; Mills et al., 2011).

### **Classificazione, biosintesi e meccanismo d'azione delle batteriocine**

Le batteriocine sono peptidi o proteine ribosomiche, sintetizzate da batteri, in grado di inibire o uccidere altri microrganismi correlati o non correlati (Leroy & De Vuyst, 2010; Cotter et al., 2005). Possono avere uno spettro ristretto, inibendo i batteri tassonomicamente vicini, o un ampio spettro, inibendo un'ampia varietà di batteri (Cotter et al., 2005; Mills et al., 2011).

Negli ultimi anni, le batteriocine hanno attirato un notevole interesse per il loro uso come conservanti alimentari sicuri, tuttavia, la loro applicazione come additivi alimentari è tuttora limitata a causa di svariati motivi, tra i quali spiccano la non ancora provata efficacia nell'eliminazione degli agenti patogeni e il loro prezzo elevato (Chen & Hoover, 2003). Eppure, l'interesse sulle batteriocine è rimasto invariato negli ultimi anni, poiché i ricercatori continuano a investigare alla ricerca di nuove e più efficaci molecole in grado di rispondere alle preoccupazioni dei consumatori e alle esigenze sia biologiche sia economiche dell'industria alimentare. L'applicazione di batteriocine per la bioconservazione degli alimenti di solito include i seguenti approcci: inoculo negli alimenti del ceppo produttore di batteriocina; aggiunta delle batteriocine purificate o semipurificate come additivo alimentare; l'aggiunta come ingrediente nella lavorazione degli alimenti di un prodotto precedentemente fermentato con un ceppo che produce batteriocine (Chen e Hoover, 2003).

Negli anni sono state isolate e identificate un gran numero di batteriocine prodotte da microrganismi sia gram-positivi che gram-negativi, il che ha permesso la creazione di database contenenti informazioni utili per la loro caratterizzazione molecolare (Blin et al., 2013; van Heel et al., 2013).

Nonostante le batteriocine prodotte dai batteri lattici (LAB) differiscano nel loro spettro di attività e nei determinanti biochimici e genetici, alcune caratteristiche comuni consentono di suddividerle in quattro classi, basate sulla struttura primaria, sul peso molecolare, sulla stabilità al calore e sull'organizzazione molecolare (Cotter et al., 2005; Heng et al., 2007):

- Classe I (lantibiotici): è costituita da peptidi lineari (tipo A) e globulari (tipo B), a basso peso molecolare (< 5 kDa, con circa 19-38 amminoacidi). Sono peptidi che subiscono delle modificazioni post- traduzionali (Cintas et al., 2001, Drider et al., 2006, Todorov, 2009). La Nisina è il primo e il più noto lantibiotico (Ghrai, Chafar, & Hani, 2012);

- Classe II (non lantibiotici): composta da peptidi termostabili (< 10 kDa, con circa 37-48 amminoacidi), che sono ulteriormente suddivisi in tre sottoclassi note come Classe IIa (gruppo di batteriocine simili alla pediocina attive contro *Listeria spp.*), Classe IIb (batteriocine che richiedono l'unione di due peptidi per esercitare completamente un effetto antibatterico, ad esempio, lattocina G) e Classe IIc (batteriocine che hanno un legame covalente tra il N-terminale e C- terminale risultando in una struttura ciclica) (Drider et al. 2006);
- Classe III: rappresentata da peptidi termolabili ad alto peso molecolare (> 30 kDa), quali Elvetina J, Acidofilcina A, e Lattacine A e B (Heng et al., 2007);
- Classe IV: composta da batteriocine complesse che contengono porzioni di carboidrati o lipidi, oltre alla porzione proteica (Heng et al., 2007). Anche se alcuni autori (Cleveland, Montville, Nes e Chikindas, 2001) sostengono che questo genere di complessi non siano una nuova classe di batteriocine ma siano in realtà artefatti di purificazione parziale.

Tra tutte le classi di batteriocine elencate la sottoclasse IIa è considerata come una delle più interessanti per il suo utilizzo sia nella conservazione degli alimenti, grazie alla sua capacità di inibire la crescita di una vasta gamma di batteri patogeni contaminanti quali *B. cereus*, *C. perfringens*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, sia in medicina, come complemento antibiotico nel trattamento di malattie infettive o come agenti antivirali (Drider et al., 2006).

Per la produzione e la secrezione di batteriocine sono necessari almeno quattro geni: il gene della batteriocina strutturale, che codifica per una pre-batteriocina; il gene dell'immunità, che codifica per una proteina dell'immunità che protegge il ceppo produttore di batteriocina dalla propria batteriocina; un gene che codifica per un trasportatore ABC (cassetta legante l'ATP) necessario per la secrezione; e un gene che codifica per una proteina accessoria di funzione sconosciuta (Drider et al. (2006). Le batteriocine possono derivare dall'espressione di un gene situato sul cromosoma o su un plasmide, o da geni differenti aventi locus cromosomici e plasmidici (Todorov, 2009).

Tali molecole hanno meccanismi d'azione distinti e possono essere suddivise tra quelle che promuovono un effetto battericida, con o senza lisi cellulare, e quelle che

inducono un effetto batteriostatico, inibendo la crescita cellulare (da Silva Sabo et al., 2014).

Per quanto riguarda la modalità d'azione, sono stati proposti diversi meccanismi per le batteriocine. Tali meccanismi dipendono direttamente da fattori legati alle specie batteriche e alle loro condizioni di crescita, alla dose di batteriocina impiegata e al grado di purificazione (Parada et al., 2007). In particolare, questi meccanismi possono promuovere un effetto battericida, con o senza lisi cellulare, o batteriostatico, inibendo la crescita cellulare (Cintas et al., 2001). Di solito il meccanismo principale con cui la maggior parte delle batteriocine prodotte dai LAB esercitano il loro effetto antibatterico consiste nella formazione di pori nella membrana della cellula bersaglio, che si traduce nella lisi osmotica della stessa (Ghraiiri et al., 2012). Nelle batteriocine di classe II questo meccanismo viene attivato quando la batteriocina si lega a un recettore proteico situato sulla membrana cellulare dei batteri bersaglio, sebbene alcuni autori ritengano che tale recettore proteico non sembri essere essenziale per il legame (Chen et al., 1997; Jack et al., 1995). Ancora, alcune batteriocine possono uccidere le loro cellule bersaglio attraverso l'inibizione dell'espressione genica (Parks et al., 2007; Vincent & Morero, 2009) e della sintesi proteica (Metlitskaya et al., 2006).

Sebbene sia stato riportato che le batteriocine mostrino una modalità d'azione battericida diretta contro le specie omologhe, alcune di esse hanno un'attività simile contro i patogeni di origine alimentare, come ad esempio la batteriocina prodotta da *P. acidilactici* che inibisce un gran numero di batteri, tra i quali *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. perfringens* e *B. cereus* (Hu, Zhao, Zhang, Yu, & Lu, 2013).

Tuttavia, l'attività antimicrobica delle batteriocine risulta essere instabile e condizionata dalle condizioni chimiche e fisiche degli alimenti. Infatti, alcuni fattori come pH, temperatura e sostanze nutritive possono interferire sulla produzione di batteriocine da parte dei LAB (Schillinger, Geisen, & Holzapfel, 1996). Inoltre, l'efficacia delle batteriocine sarebbe influenzata anche dalla presenza di enzimi come le proteasi, dal verificarsi di reazioni di ossido-riduzione, dall'interazione con i componenti della formula alimentare (grassi, proteine, conservanti) e dai vincoli di diffusione dovuti all'elevata concentrazione di sale. Inoltre, l'azione delle batteriocine può essere influenzata dalla presenza di nitrati e nitriti e dalla bassa attività dell'acqua, che può portare ad una distribuzione inadeguata della

batteriocina in tutto il prodotto alimentare (Alves et al., 2006; Schillinger et al., 1996).

### **Batteri lattici produttori di batteriocine (LAB)**

I batteri lattici, o LAB, sono un gruppo eterogeneo di batteri Gram-Positivi, immobili, non sporigeni, di forma bastoncellare o coccica. In natura ne esistono almeno 60 specie e la maggior parte di questi non sono patogeni, tanto che alcuni di essi risultano avere una relazione simbiotica con il corpo umano. Il loro nome deriva dal fatto che hanno come caratteristica comune quella di produrre acido lattico come prodotto primario della fermentazione anaerobica. Questi microrganismi, anaerobi o aerotolleranti, sono resistenti agli acidi, con un optimum di crescita a valori di pH compresi tra 4,0 e 4,5 e temperatura compresa tra 30 °C (mesofilo) e 42 °C (termofilo) (Todorov & Franco, 2010).

I LAB non posseggono i citocromi ed una catena di trasporto degli elettroni; perciò, traggono energia dalla sola fosforilazione a livello del substrato durante la fermentazione degli zuccheri. Questo gruppo di batteri risulta avere esigenze nutrizionali complesse poiché per il loro sviluppo richiedono amminoacidi, purine, pirimidine e vitamine. Sebbene ci siano diversi microrganismi che producono batteriocine, quelle prodotti dai batteri lattici (LAB) sono di particolare interesse per l'industria lattiero-casearia (Egan et al., 2016). Il gruppo dei LAB associati agli alimenti comprende 11 generi: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* (di gran lunga il genere più indagato), *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Mogensen et al., 2003, De Vries et al., 2006). Tra questi, diversi sono stati a lungo utilizzati in una varietà di prodotti alimentari fermentati grazie alla loro capacità di convertire il lattosio in acido lattico, oltre a produrre molecole antimicrobiche aggiuntive come altri acidi organici, diacetile, acetoina, perossido di idrogeno, peptidi antifungini e batteriocine (Egan et al., 2016). Come risultato del loro ampio uso nei prodotti fermentati tradizionali, la maggior parte dei LAB è stata considerata sicura (Generally Recognized As Safe) dall'American Food and Drug Agency (FDA) e dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), ad eccezione di alcune specie appartenenti al genere *Enterococcus* e *Streptococcus* (EFSA, 2007).

Secondo il concetto avanzato da Holzapfel (1995), con il termine colture protettive ci si riferisce a quei microrganismi che, presenti naturalmente o aggiunti

intenzionalmente, hanno l'effetto di conservare/proteggere un prodotto alimentare. I microrganismi di cui si è parlato in relazione all'antagonismo lattico risponde a tale definizione. Le colture protettive, di cui i batteri lattici costituiscono il gruppo più ampio e importante, possiedono importanti proprietà, tra le quali il fatto di non rappresentare un pericolo per la salute, di avere effetti benefici sul prodotto e non determinare effetti negativi sulle proprietà sensoriali. Le colture protettive rientrano quindi nella strategia del "biocontrollo", termine con il quale si indica l'impiego di uno o più microrganismi per inibire o controllare altri microrganismi. Il controllo può essere attuato direttamente da un microrganismo vitale (per esempio un fago) oppure può essere il risultato di azioni o di agenti indiretti (come la produzione di batteriocine). Il fenomeno dell'inibizione o dell'uccisione da parte dei batteri lattici di microrganismi strettamente correlati, patogeni o alteranti, che sono presenti in coltura mista è noto da oltre 80 anni, tuttavia, il meccanismo di tale fenomeno non è ancora chiaro. È noto che tra i fattori responsabili vi sono la produzione di antibiotici, perossido di idrogeno, diacetile e diversi prodotti secondari del metabolismo (come l'acido lattico prodotto dai lattobacilli), gli agenti litici, le esotossine e le batteriocine, in aggiunta alla riduzione del pH e al consumo di nutrienti; un vero e proprio "arsenale biologico" di straordinaria diversità e abbondanza (Egan et al., 2016).

Le batteriocine prodotte dai batteri lattici sono spesso attive in un vasto range di valori di pH, sono resistenti alle alte temperature e sono attive contro una serie di batteri patogeni e responsabili del deterioramento degli alimenti (Ahmad et al., 2017). Inoltre, essendo sensibili alle proteasi digestive come il complesso della pancreatina, la tripsina e la chimotripsina, non hanno un impatto negativo sul microbiota intestinale (Egan et al., 2016). La produzione di batteriocine si verifica spesso al termine della fase esponenziale di crescita o all'inizio della fase pre-stazionaria ed è generalmente influenzata da un meccanismo di *quorum sensing* o da qualsiasi segno di stress (Martinez et al., 2013). La maggiore differenza con gli antibiotici risiede nella natura proteica delle batteriocine, a causa della quale vengono rapidamente degradate dalle proteasi del tratto digestivo umano (Parada et al., 2007).

### ***Lactobacillus plantarum***

Tra i LAB, il gruppo più numeroso è costituito dal genere *Lactobacillus*, che comprende più di 150 specie diverse (Siezen, et al., 2010), alcune delle quali associate alla promozione di benefici per la salute dell'ospite (Bosch et al., 2011). Tra questi, *Lactobacillus plantarum* riveste particolare importanza. È un batterio Gram-positivo di forma bastoncellare in grado di crescere a temperature comprese tra 15 e 45° C ed a bassi livelli di pH intorno a 3,2 (Kleerebezem et al., 2003).

*Lactobacillus plantarum* a differenza di altri lattobacilli è in grado di colonizzare differenti nicchie ecologiche come il tratto gastrointestinale dei mammiferi, la saliva umana e diversi alimenti fermentati come i prodotti lattiero- caseari (Hammes & Vogel, 1995; Parente et al., 2010). Il carattere ubiquitario di tale specie può essere attribuito sia allo spiccato vigore fermentativo sia ad altre caratteristiche come l'elevata capacità acidificante, riscontrabile in tutti i ceppi. Questo batterio, inoltre, è in grado di tollerare l'acidità e i sali biliari, il che gli consente di sopravvivere al passaggio attraverso il tratto gastrointestinale dell'uomo. (De Vries et al., 2005).

L'abilità di colonizzare diversi ambienti può essere attribuita al suo genoma, il quale risulta essere relativamente grande rispetto ad altre specie di *Lactobacillus*. Il sequenziamento completo del genoma di diversi ceppi di *L. plantarum* così come studi di genomica comparativa ha messo in evidenza la presenza di variazioni significative da ceppo a ceppo (Koistinen et al., 2007). Questi studi hanno rivelato la grande complessità del genoma che possiede 3000 geni che codificano per circa 320 proteine putative molte delle quali coinvolte nel trasporto cellulare, una minima parte sono proteine di legame e le restanti sono proteine con funzione regolativa coinvolte nel metabolismo energetico (Quatravaux et al., 2006). Il genoma possiede inoltre 3 plasmidi extracromosomici e una regione chiamata "lifestyle adaptation island", vicina all'origine della replicazione, particolarmente importante per l'adattamento del microrganismo ai diversi habitat, in quanto responsabile della regolazione e sintesi degli enzimi coinvolti nell'utilizzo delle diverse fonti di carbonio e nell'interazione con l'ambiente (Molenaar et al., 2005; Siezen et al., 2010).

Inoltre, il genoma codifica due classi di trasposasi, coinvolte nello scambio di materiale genetico, che si pensa possano avere un ruolo nel trasferimento da un ceppo all'altro di geni coinvolti nella sintesi di peptidi con attività antimicrobica (Kleerebezem et al., 2003). È noto, infatti, come *L. plantarum* sia in grado di



produrre metaboliti dotati di attività antimicrobica capaci di inibire lo sviluppo di alcuni microrganismi patogeni tra i quali *L. monocytogenes* (Mills et al., 2011). Tale proprietà fa di questa specie un ottimo candidato per l'impiego in tecniche di biocontrollo nella conservazione di alimenti (Sorrentino et al., 2013). Le proprietà antimicrobiche espresse da *L. plantarum* possono essere riconducibili a diversi meccanismi: la produzione di composti antimicrobici quali batteriocine, sostanze batteriocina simili (BLIS), acido fenilattico, acidi organici (principalmente acido lattico e acido acetico), perossido di idrogeno e la competizione per nutrienti (Todorov et al., 2011; Reis et al., 2012).

Diversi studi si sono concentrati sull'ottimizzazione del terreno di coltura e delle condizioni di crescita al fine di aumentare la produzione di batteriocine da parte di *L. plantarum* (Delgado et al., 2007; Leal-Sánchez et al., 2002; Todorov et al. 2004). Nonostante il gran numero di studi effettuati fino a questo momento, c'è ancora poca conoscenza delle condizioni di crescita necessarie per una produzione ottimale di batteriocine da parte di *L. plantarum*. È noto che la crescita cellulare di tale microrganismo è direttamente influenzata da una serie di fattori, tra i quali le condizioni di pH, temperatura, composizione del mezzo e tasso di aerazione. Poiché i LAB sono piuttosto esigenti in termini di requisiti nutrizionali, un mezzo ricco è estremamente necessario per una buona crescita e una conseguente produzione di batteriocine (Brinques et al., 2010).

Nel tempo sono state isolate e descritte un'ampia varietà di batteriocine prodotte da diversi ceppi di *L. plantarum*. La maggior parte di queste appartengono al gruppo delle plantaricine, batteriocine con una massa molecolare generalmente compresa tra 3,0 e 10,0 kDa e la cui produzione sembra essere codificata principalmente a livello cromosomico (Messi et al., 2001). Tuttavia, alcuni studi hanno dimostrato la capacità di alcuni ceppi di produrre una batteriocina diversa dalla plantaricina; infatti, da un prodotto lattiero-caseario fermentato tradizionale cinese è stato isolato un ceppo di *L. plantarum* produttore di una pediocina. Questa batteriocina era particolarmente attiva contro una vasta gamma di batteri patogeni, tra i quali ceppi appartenenti ai generi *Listeria*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, ed *E. coli*. I determinanti genetici per la produzione di tale pediocina avevano localizzazione plasmidica (Xie et al., 2011).

## **Pediocina**

La pediocina è una batteriocina appartenente alla sottoclasse IIa ed è prodotta da diversi ceppi appartenenti alla specie *Pediococcus spp.* come *P. acidilactici*, *P. claussenii*, *P. cellicola*, *P. damnosus*, *P. ethanolidurans*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* e *P. stilesii* (Haakensen et al., 2009; Porto et al., 2017). Si tratta di peptidi idrofobici resistenti al calore, infatti, sono in grado di mantenere la loro attività battericida anche durante il trattamento termico, alcune volte anche a temperature di sterilizzazione. Sono in grado, inoltre, di tollerare basse temperature, rimanendo stabili anche a -80°C; mantengono la loro attività dopo i trattamenti con lipasi, lisozima, fosfolipasi C, DNasi o RNasi, mentre sono sensibili alla maggior parte degli enzimi proteasici come pepsina e tripsina (Khorshidian, 2021).

Le pediocine tra le batteriocine naturali sono le biomolecole che esercitano un più ampio spettro di attività antimicrobica contro i batteri Gram-positivi, in particolare contro i batteri patogeni, come *L. monocytogenes*. Proprio grazie a questa sua attività tale batteriocina presenta grosse potenzialità nell'utilizzo in vari prodotti alimentari allo scopo di controllare la crescita di *L. monocytogenes*, agente patogeno di origine alimentare che rappresenta una grande preoccupazione nell'industria alimentare (Mokoena, 2017; Porto et al., 2017). La pediocina può essere utilizzata in quest'ambito attraverso due approcci, sia attraverso l'aggiunta *in situ* dei ceppi produttori di batteriocina (*Pediococcus*, *Enterococcus* o *Lactobacillus*) in modo da produrre tale molecola in condizioni controllate direttamente nella matrice alimentare, sia attraverso l'aggiunta diretta della pediocina nella matrice alimentare ad una concentrazione ottimale al controllo dei patogeni contaminanti (Silva et al., 2018; Ng et al., 2020).

Questa batteriocina si è dimostrata più efficace della nisina contro alcuni agenti patogeni di origine alimentare come *L. monocytogenes* e *S. aureus* (Cintas et al., 1998; Eijsink et al., 1998) e organismi Gram-negativi come *Pseudomonas* ed *Escherichia coli* (Jamuna & Jeevaratnam, 2004). La potenziale applicazione della pediocina ai prodotti lattiero-caseari è ulteriormente migliorata dalla sua stabilità in soluzioni acquose, dalla sua ampia gamma di pH e dall'elevata resistenza al riscaldamento o al congelamento (Sobrino-López & Martín-Belloso, 2008). Nonostante questo alto potenziale, pochi studi hanno approfondito l'aggiunta di pediocine al latte o ai latticini. È stato riconosciuto il ruolo della pediocina (PA- 1) nel ridurre il numero di *L. monocytogenes* in prodotti come ricotta, panna e crema

di formaggio, nei quali l'effetto anti-listeria era evidente sia in un ampio intervallo di temperatura che di pH ed era particolarmente efficace nei casi in cui si partiva da una bassa contaminazione iniziale di *L. monocytogenes* ( $10^2$  UFC/ml) (Verma et al., 2017).

### **Applicazione di batteriocine purificate/semipurificate ai prodotti lattiero-caseari**

Nonostante i recenti progressi nella ricerca, l'uso di batteriocine purificate nell'industria lattiero-casearia rimane limitato sia per l'elevato costo dell'isolamento e della purificazione, sia a causa della legislazione alimentare restrittiva delle autorità di regolamentazione sanitaria (FDA ed EFSA) che limita l'approvazione di nuove batteriocine come conservanti alimentari. Per tale motivo, l'uso di batteri produttori di batteriocine per controllare i microrganismi contaminanti è un'alternativa all'utilizzo di batteriocine purificate come additivi alimentari. Infatti, l'incorporazione di tali batteri negli alimenti offre una soluzione pratica per il controllo dei microrganismi contaminanti in aggiunta al fatto che i LAB sono comunemente usati come colture starter nelle fermentazioni alimentari.

Molti studi hanno mostrato il potenziale dell'applicazione di batteriocine o ceppi produttori di batteriocina negli alimenti, come carne, latticini, pesce, bevande alcoliche, insalate e verdure fermentate (O'Sullivan et al., 2003; Ramu et al., 2015) ma ad oggi, solo la nisina (Nisaplin, Danisco) e la pediocina PA1 (Microgard<sup>TM</sup>, ALTA 2431, Quest) sono state commercializzate come conservanti alimentari (Simha et al., 2012). Sebbene altre batteriocine offrano prospettive promettenti per essere utilizzate come bioconservanti, il loro utilizzo nell'industria alimentare richiede come presupposto alcuni criteri importanti: i ceppi produttori dovrebbero essere commestibili, mostrare un ampio spettro di inibizione, presentare un'attività specifica elevata, non avere rischi per la salute, presentare effetti benefici (ad esempio, migliorare la sicurezza, la qualità e il sapore degli alimenti), mostrare stabilità al calore e al pH, solubilità e stabilità ottimali per un particolare alimento (Cotter et al., 2005; Leroy e De Vuyst, 2010).

Vari autori hanno riferito che l'inattivazione di diversi agenti patogeni di origine alimentare da parte delle batteriocine può differire notevolmente a seconda della matrice alimentare utilizzata (Muñoz et al., 2007), pertanto, l'efficacia delle diverse batteriocine per i vari agenti patogeni di origine alimentare deve essere testata in

tutti i sistemi alimentari. Come già sottolineato in precedenza, tra i principali contaminanti degli alimenti pronti al consumo *L. monocytogenes* è tra i patogeni che destano maggiori preoccupazioni soprattutto per il rischio di contaminazione che può verificarsi nelle fasi successive alla lavorazione (Melo et al., 2015). Di conseguenza, le batteriocine attive contro *Listeria* emergono come una soluzione ideale per prevenire la crescita di questo agente patogeno dopo la lavorazione o l'imballaggio (Cotter et al., 2005).

Sono state isolate e segnalate oltre 230 batteriocine prodotte da LAB, ma solo la metà di esse sono state identificate a livello proteico o di DNA (Alvarez-Sieiro et al., 2016) e solo un numero limitato di batteriocine, purificate o semipurificate, sono state testate nei sistemi alimentari, specialmente nei latticini. È stato notato che l'applicazione di ceppi LAB produttori di batteriocina come colture protettive può conferire un vantaggio rispetto all'uso di batteriocine semipurificate o purificate, le quali spesso vengono adsorbite dalle matrici alimentari e sono facilmente degradabili, il che si traduce in una perdita di attività antibatterica (Muñoz et al., 2007).

Oltre ai ceppi batteriocinogeni naturali, nei latticini è stata testata la produzione eterologa di batteriocine da parte di LAB geneticamente ingegnerizzati, dove le capacità adattative della coltura batterica erano potenziate dalla presenza di geni responsabili della produzione di batteriocine le cui potenzialità antimicrobiche erano superiori rispetto a quelle prodotte dai batteri naturalmente (McAuliffe et al., 1999).

Le uniche batteriocine attualmente impiegate nella conservazione degli alimenti sono quelle prodotte da LAB utilizzati nella produzione di alimenti fermentati (Montville & Winkowski, 1997). Poiché i LAB sono stati utilizzati per secoli per fermentare gli alimenti, godono dello status GRAS (generalmente considerato sicuro) dalla Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti. Ciò ne consente l'uso negli alimenti fermentati senza ulteriore approvazione normativa (Montville & Winkowski, 1997).

La nisina è stata la prima batteriocina ad essere isolata e approvata per l'uso negli alimenti, in particolare per prevenire la crescita di spore di *Clostridium botulinum* nelle creme spalmabili di formaggio in Inghilterra (Chung et al., 1989). Nel 1988, la FDA aveva approvato il suo uso come bioconservante per una gamma ristretta di alimenti, compresi gli ovoprodotti pastorizzati. Ad oggi, la nisina è accettata come

conservante alimentare sicuro da oltre 45 Paesi, ed è la batteriocina commerciale più utilizzata nonché l'unica che possa essere aggiunta agli alimenti statunitensi. Anche in Europa l'EFSA ha concesso lo status di Presunzione qualificata di sicurezza (QPS) a numerosi generi di LAB, come *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e alcuni *Streptococcus* (EFSA, 2007), i quali sono utilizzati in larga misura nell'industria lattiero-casearia. Al contrario le batteriocine purificate rientrano nella definizione di additivi alimentari e, di conseguenza, in Europa il loro uso è disciplinato dal regolamento (CE) n. 1333/2008. Solo gli additivi alimentari autorizzati ed inclusi nel Regolamento, in particolare nell'allegato II, possono essere inseriti nel mercato ed utilizzati negli alimenti alle condizioni d'uso specificate. La procedura di autorizzazione degli additivi alimentari (o di eventuali nuovi utilizzi di additivi già autorizzati), definita dal Regolamento CE 1331/2008, prevede la presentazione di una richiesta formale alla Commissione Europea e la successiva valutazione da parte dell'EFSA sulla sicurezza della sostanza in questione per gli usi previsti. Gli additivi alimentari autorizzati devono inoltre essere conformi ai criteri di purezza approvati previsti dal Regolamento UE 231/2012. La nisina (E 234) è attualmente l'unica batteriocina autorizzata quale additivo alimentare nell'Unione Europea per l'uso negli alimenti specificati dal Regolamento (alcuni prodotti caseari, uova liquide pastorizzate e altri). Nonostante i recenti progressi nella ricerca, l'uso di batteriocine purificate nelle produzioni alimentari e in particolare nell'industria lattiero-casearia rimane limitato. La motivazione circa l'uso poco diffuso di tali composti risiede nel fatto che frequentemente l'applicazione delle sole batteriocine in purezza non fornisce una protezione sufficiente nei confronti di contaminazione e crescita batterica nel prodotto; inoltre, l'alto costo delle procedure di isolamento e purificazione di tali composti limita l'esplorazione commerciale di nuove batteriocine (Silva et al., 2018).

## SCOPO DELLA TESI

Il progetto di ricerca aveva come obiettivo l'adozione di innovazioni tecnologiche per garantire la sicurezza alimentare di formaggi freschi a base di latte ovino. Tra i formaggi freschi a base di latte ovino, il "Primo Sale", uno dei prodotti più caratteristici, prodotto presso l'azienda F.Ili Pinna Industria Casearia S.p.A, è un formaggio a breve stagionatura con crosta morbida e pasta semidura. Tali caratteristiche tecnologiche e la composizione (pH,  $a_w$ ) conferiscono al Primo Sale caratteristiche di permissività in grado di favorire, in presenza di contaminazioni, lo sviluppo di microrganismi alteranti o patogeni in misura tale da determinare casi di malattia alimentare (ad es. listeriosi) o il ritiro del prodotto dal commercio.

La listeriosi è una grave tossinfezione alimentare, relativamente rara ma preoccupante in quanto, pur avendo una bassa prevalenza, presenta tassi di ospedalizzazione (97,1 %) e mortalità (13,0%) piuttosto elevati (EFSA & ECDC, 2021). *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) è l'agente eziologico della listeriosi la cui principale via di trasmissione è rappresentata dagli alimenti contaminati, in particolare i cibi pronti al consumo (RTE: Ready to Eat Foods). Questi, definiti "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 2073/05) comprendono diverse categorie di alimenti, compresi i prodotti lattiero-caseari.

La sempre maggiore consapevolezza dei consumatori e la preoccupazione per l'utilizzo di conservanti chimici hanno portato i ricercatori a concentrarsi sull'identificazione di efficaci composti antimicrobici naturali. A questo proposito, alcuni batteri lattici (LAB: lactic acid bacteria) hanno mostrato un grande potenziale nella conservazione degli alimenti e sembra che siano in grado di ridurre o eliminare la necessità di aggiungere additivi chimici garantendo alimenti di alta qualità (Perez et al., 2014). Le modalità con le quali tali batteri esercitano la propria attività antimicrobica sono varie e tra queste particolare interesse suscita il ruolo delle batteriocine. Le batteriocine prodotte dai LAB svolgono un ruolo molto importante nell'industria alimentare come conservanti naturali e la maggior parte di esse sono generalmente riconosciute come sicure (GRAS: Generally Recognized As Safe) (Kumar et al. 2016; Lan et al., 2012; Merzoug et al. 2016). Nonostante i recenti progressi nella ricerca, l'uso di batteriocine purificate nell'industria lattiero-casearia

rimane limitato sia per l'elevato costo dell'isolamento e della purificazione, sia a causa della legislazione alimentare restrittiva delle autorità di regolamentazione sanitaria (FDA ed EFSA) che limita l'approvazione di nuove batteriocine come conservanti alimentari (Reg. CE 1333/2008).

Le soluzioni proposte erano centrate sull'utilizzo di colture protettive nella produzione del Primo Sale il che rappresenta una significativa innovazione rispetto alle attuali tecnologie adottate dalle imprese del comparto, con la prospettiva di una rapida integrazione delle stesse nei processi della produzione industriale e di commercializzazione. La coltura protettiva scelta per tale scopo era rappresentata da una coltura commerciale liofilizzata, *Listeria Dairy* (Holdbac, Danisco) a base di ceppi di *Lactobacillus plantarum*. La scheda tecnica allegata alla coltura non forniva indicazioni circa il ceppo di *L. plantarum* utilizzato né sul meccanismo attraverso il quale tale coltura era in grado di inibire la crescita del patogeno contaminante. Pertanto, è stato condotto uno studio preliminare sulla coltura protettiva allo scopo di caratterizzarne l'attività antimicrobica esercitata nei confronti di *L. monocytogenes* ed avere informazioni utili da utilizzare per la successiva esecuzione del challenge test sul formaggio Primo Sale. Lo scopo finale del lavoro era quello di comprendere il meccanismo attraverso il quale la coltura protettiva inibiva la contaminazione da parte del patogeno, qual era il composto o i composti responsabili di tale attività e in che modo era possibile potenziare tale facoltà e trasferirla nei processi di produzione industriale del formaggio fresco ovino Primo Sale, in modo da attuare quelle strategie di biocontrollo necessarie a inibire la contaminazione del prodotto da *L. monocytogenes*.

## **MATERIALE E METODI**

### **Tecnologia di produzione del Primo Sale**

Il Primo Sale è un formaggio fresco a latte ovino pastorizzato. La tecnologia di produzione prevede il trattamento termico del latte ovino a 61,5° C per 15/20 secondi e il successivo raffreddamento in polivalente alla temperatura di 38° C. Una volta raggiunta la temperatura si procede all'inoculo di starter liofilizzati e di sale nella percentuale del 0,8%. Successivamente si procede all'aggiunta del caglio di agnello in pasta, opportunamente diluito e filtrato con garze a maglia fina. Dopo alcuni minuti di miscelazione le pale della polivalente vengono bloccate e inizia la fase della coagulazione della cagliata che avviene in circa 15 minuti. Una volta che il casaro verifica l'avvenuto indurimento della cagliata si procede alla rottura del coagulo riattivando il moto circolare delle pale della polivalente per circa un minuto. Segue la fase di sosta della cagliata a bagno nel siero e una seconda fase di rottura più veloce. Una volta completata la sineresi in polivalente si procede con lo scarico della cagliata direttamente negli stampi in teflon. La fase successiva prevede cinque ribaltamenti consecutivi a circa 10 minuti l'uno dall'altro.

Il prodotto viene poi trasferito in camera calda fino al raggiungimento del pH di 6,20, momento in cui le forme vengono trasferite in cella refrigerata alla temperatura di 4° C per circa 24 ore. Successivamente le forme vengono immerse in salamoia satura di cloruro di sodio e lasciate in immersione per circa 6 ore. Il prodotto viene lasciato asciugare e confezionato sottovuoto in film plastico termoretraibile.

Le forme così prodotte hanno un peso di circa 1,5 Kg, forma cilindrica, con piatto di circa 12 cm e scalzo di 10 cm circa. La superficie della forma è edibile e presenta un leggera rigatura dovuta agli stampi. La pasta si presenta bianca e compatta con una lieve occhiatura. La shelf-life è di circa 21 giorni a confezione.

### **Campionamento Primo Sale**

La fase del progetto da svolgere presso lo stabilimento caseario F.lli Pinna s.p.a. prevedeva la valutazione delle diverse fasi tecnologiche di produzione, dei parametri di processo e di prodotto che potevano influire sulla sicurezza del prodotto stesso. A tale scopo sono stati valutati i parametri chimico fisici e microbiologici del prodotto caseario al fine di stabilire se lo stesso fosse in grado



di supportare la crescita del patogeno *Listeria monocytogenes*, secondo i criteri stabiliti nel Reg. CE 2073/2005.

Il campionamento è stato eseguito su tre lotti di produzione del formaggio fresco ovino “Primo Sale”. Per ciascuno lotto sono stati prelevati i seguenti campioni:

- 100 ml di siero, raccolto in seguito alla rottura della cagliata;
- 300 gr di cagliata, raccolta in seguito allo scarico dalla polivalente all'interno delle forme (cagliata pre- salamoia);
- 300 gr di primo Sale, raccolto da 3 forme diverse, dopo 6 ore di salamoia, prima dello stoccaggio delle stesse a 4°C (cagliata post-salamoia).

#### **Analisi parametri chimici: pH e $a_w$**

La parte preliminare riguardava la valutazione dei parametri chimici, quali pH (concentrazione di ioni H<sup>+</sup>) e attività libera dell'acqua,  $a_w$  (molecole di acqua presenti nell'alimento e disponibili al metabolismo batterico). Per tale scopo un'aliquota di ciascun campione (del peso di 10 gr), ad eccezione del siero, è stata sminuzzata finemente, mediante l'utilizzo di un macinino elettrico, ed è stata omogenizzata con un uguale volume di acqua distillata sterile (10 ml). Il pH del campione in esame è stato misurato, eseguendo due misurazioni per ciascun campione in modo da ottenere un valore medio che si avvicinasse quanto più possibile a quello reale.

Per la misurazione dell' $a_w$  dei campioni di cagliata pre e post salamoia, un'aliquota, del peso di circa 10 gr, è stata sminuzzata finemente e una piccola parte è stata collocata all'interno di una capsula (riempiendo la stessa fino a metà del suo volume), la quale a sua volta è stata posta all'interno della camera di misurazione dello strumento Aqualab (Steroglass). Sono state eseguite due misurazioni consecutive per ciascun campione esaminato.

#### **Analisi microbiologiche: ricerca di *Listeria monocytogenes* e *Listeria spp.***

I campioni di cagliata pre-salamoia e post- salamoia sono stati contestualmente utilizzati per l'analisi microbiologica secondo metodica qualitativa UNI EN ISO 11290-1:2017, con lo scopo di valutare il livello di contaminazione del prodotto da *L. monocytogenes* e *Listeria spp.*

Pertanto, sono stati pesati 25 gr di ciascun campione e addizionati, all'interno di un sacchetto Stomacher, a 250 ml di Listeria Fraser Broth Half Concentration (Biolife) ottenendo una diluizione 1:10. I campioni sono stati quindi omogenizzati nello

stomacher per circa 2 minuti e incubati per 24 ore a 30°C. A questo punto un'aliquota (1ml) di ciascun brodo di pre-arricchimento, Listeria Fraser Broth *Half Concentration*, è stata aggiunta ad una provetta sterile contenente 10 ml di Listeria Fraser Broth addizionata con il supplemento di ferro ammonio citrato (Biolife). I brodi di arricchimento sono stati quindi incubati a 37°C per 24 ore e un'aliquota di ciascuno (100 µl) è stata seminata su piastre di ALOA (Agar Listeria acc. to Ottaviani & Agosti), terreno selettivo, cromogenico e differenziale che consente di discriminare tra le colonie di *L. monocytogenes* (colonie verdi-blu circondate da un alone opaco) e *Listeria spp.* non *monocytogenes*, colonie verde-blu senza alone. Le piastre di ALOA sono state quindi incubate a 37°C per 24/48 ore (UNI EN ISO 11290-1:2017).

I ceppi con caratteristiche di crescita tipiche, riferibili a *Listeria spp.* e *L. monocytogenes* ottenuti sono stati mantenuti ad una temperatura di -80°C in Brain Heart Infusion broth (BHIB, Biolife, Italia) contenente glicerolo al 20% e conservati per la successiva identificazione molecolare di specie.

### **Rilevazione e mappatura dei siti di contaminazione da *Listeria monocytogenes* negli ambienti di produzione**

Per valutazione il rischio di contaminazione del prodotto da *L. monocytogenes* è stato predisposto un programma di mappatura per individuare i potenziali siti di contaminazione presenti negli ambienti di lavorazione dello stabilimento caseario. Sono state individuate cinque aree:

1. Locale di salatura;
2. Locale stagionatura;
3. Locale lavaggio forme;
4. Locale stoccaggio (cella frigo 4°C);
5. Locale confezionamento.

I campionamenti ambientali sono stati ripetuti settimanalmente per un totale di otto settimane. A tale scopo sono stati utilizzati dei kit commerciali (3M, St. Paul, Minnesota, USA) contenenti sponge sterili pre-inumidite con dell'acqua peptonata neutra (substrato utile per il mantenimento dei microrganismi durante il trasporto), guanti sterili e sacchetto sterile per il trasporto della sponge a temperatura di  $4 \pm 2$  °C.

In ciascun locale il campionamento è stato eseguito prelevando il materiale presente sulla superficie e all'interno delle rispettive canalette di scolo. Le sponge impregnate del materiale campionato sono state quindi riposte all'interno di un sacchetto sterile e trasportate presso la Facoltà di Medicina Veterinaria di Sassari, settore di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale (IAOA) per le successive analisi.

### **Analisi microbiologica dei campioni ambientali: ricerca di *Listeria monocytogenes***

Su tutte le sponge ambientali campionate (10 a settimana per un totale di 80 campioni) è stata eseguita la ricerca di *L. monocytogenes* utilizzando le metodiche per la rilevazione qualitativa del microrganismo previste dai protocolli d'analisi UNI EN ISO 11290-01:2017.

I ceppi con caratteristiche di crescita tipiche, riferibili a *L. monocytogenes*, sono stati mantenuti ad una temperatura di -80° C in Brain Heart Infusion broth (BHIB, Biolife, Italia) contenente glicerolo al 20% e conservati per le successive analisi molecolari.

### **Identificazione molecolare degli isolati**

I ceppi con caratteristiche di crescita tipiche, riferibili a *L. monocytogenes*, derivanti dai campionamenti sulla cagliata pre e post salamoia e dai campionamenti ambientali, e mantenuti ad una temperatura di -80° C, sono stati utilizzati per l'identificazione molecolare degli isolati.

### **Estrazione del DNA**

Gli isolati sono stati preliminarmente sottoposti all'estrazione del DNA mediante il kit di purificazione Wizard Genomic (Promega Corp., Madison, WI), secondo le istruzioni della casa produttrice. Inizialmente, sono stati seminati su piastre di Brain Heart Infusion agar (BHA, Biolife, Italia) ed incubati a 37°C per 24 ore; da ciascuna piastra, una colonia è stata trasferita in 3 ml di Brain Heart Infusion Broth (BHIB, Biolife, Italia) e posta ad incubare a 37°C per 24 ore. Sono state quindi lisate le cellule batteriche ponendole a contatto con lisozima (1 mg / ml) a 37 ° C per 1 ora. Successivamente alla sospensione batterica sono stati addizionati 600 µl di Nuclei Lysis Solution (50 ml) e incubati ad 80° C per 5 sec. In seguito, sono stati aggiunti

in sequenza: 5 µl di RNase Solution, e incubata a 37° C per 45 sec., e 200 µl di Protein Precipitation Solution. Dopo aver centrifugato la miscela, il surnatante è stato trasferito in 600 µl di Isopropanolo (AppliChem), centrifugato a 13-16000 giri per 2 sec. ed il pellet addizionato a 600 µl di Etanolo al 70% (AppliChem) e centrifugato a 13-16000 giri per 2 sec. Il surnatante così ottenuto è stato, infine, risospeso in 100 µl di DNA Rehydration Solution e conservato a -20° C in attesa delle successive analisi.

### Identificazione dei ceppi mediante multiplex PCR

La PCR multiplex è stata sviluppata secondo il protocollo descritto da Ryu et al. (2013) modificato, al fine di visualizzare sette bande differenziali in un'unica reazione ed identificare i ceppi appartenenti al genere *Listeria spp.* e *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri*. Sono stati, inoltre, utilizzati come ceppi di referenza *L. monocytogenes ATCC19111*, *L. seeligeri ATCC35967*, *L. ivanovii ATCC 19119*, *L. grayi ATCC 25401*, *L. innocua DSMZ 20649* e *L. welshimeri DSMZ 20650*, acquistati presso l'American Type Culture Collection (ATCC) e il Leibniz-Institut DSMZ- Deutsche Sammlung von und Mikroorganismen Zellkulturen GmbH (DSMZ). La reazione di amplificazione prevedeva un volume finale di 25 µl contenente: buffer PCR 5X (Flexi Buffer Green GoTaq, Promega), 0,1 mM di Dntps mix (10 mM, Sigma), i primers *Prs*, *JOgrayi*, *Lin0464*, *Liv22228*, *Lmo1030*, *Iseelin*, *Lwe1801* (le cui concentrazioni sono indicate in Tabella 1), 4 mM di MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen), 2 U di Taq polimerasi (GOTAQ Hot start 5U/µl, Promega), 1 µl di DNA ed infine H<sub>2</sub>O milliq sterile fino al raggiungimento del volume finale. Il profilo termico utilizzato era il seguente:

Fase	N.cicli	Temperatura	Tempo
<i>Pre-incubazione</i>	1	94 °C	5 min
<i>Amplificazione</i>	35	<i>Denaturazione</i> 94 °C	30 s
		<i>Annealing</i> 58 °C	30 s
		<i>Estensione</i> 72 °C	30 s
<i>Incubazione finale</i>	1	72°C	5 min

Tabella 1 Primers utilizzati per l'identificazione di specie di *Listeria*

Specie	Gene	Primer	Sequenza	Prodotto	Concentrazione Primer
<i>Genere Listeria</i>	<i>prs</i>	PrsF	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	370	0.4 $\mu$ M
		PrsR	CAAAGAAACCTTGGATTGCGG		
<i>L. grayi</i>	<i>Oxidoreductasi</i>	JOgrayiF	GCGGATAAAGGTGTTCCGGGTCAA	201	0.24 $\mu$ M
		JOgrayiR	ATTTGCTATCGTCCGAGGCTAGG		
<i>L. innocua</i>	<i>Lin0464</i>	Lin0464F	CGCATTATCGCCAAAACCTC	749	2.5 $\mu$ M
		Lin0464R	TCGTGACATAGACGCGATTG		
<i>L. ivanovii</i>	<i>namA</i>	Liv22228F	CGAATTCCTTATTCACITGAGC	463	0.52 $\mu$ M
		Liv22228R	GGTGCTGCGAACTTAACCTCA		
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Lmo1030</i>	Lmo1030F	GCTTGTATTCACTTGGATTGTCTGG	509	0.56 $\mu$ M
		Lmo1030R	ACCATCCGCATATCTCAGCCAACT		
<i>L. seelingeri</i>	<i>Lmo0333</i>	IseelinF	GTACCTGCTGGGAGTACATA	673	1.36 $\mu$ M
		IseelinR	CTGTCTCCATATCCGTACAG		
<i>L. welshmeri</i>	<i>scrA</i>	Lwe1801F	CGTGGCACAATAGCAATCTG	281	2.5 $\mu$ M
		Lwe1801R	GACATGCCTGCTGAACTAGA		

Gli amplificati finali sono stati quindi sottoposti ad elettroforesi mediante gel di agarosio 3% in tris-acetato-EDTA (TAE) 1X (Invitrogen, USA), visualizzati mediante l'impiego del sistema Gel-Doc UV trans illuminator (Bio-Rad, USA) e le immagini elaborate con il software Quantity-One (Bio-Rad, USA).

### **Determinazione del sierotipo de ceppi di *L. monocytogenes* ambientali mediante multiplex**

Una selezione di ceppi di *L. monocytogenes*, elencati in Tabella 2, derivanti dal campionamento ambientale presso i locali dell'industria casearia F.lli Pinna di Thiesi sono stati propagati in terreno non selettivo BHA e successivamente analizzati mediante multiplex PCR per identificare il sierotipo di appartenenza.

Tabella 2 Elenco dei ceppi ambientali di *Listeria monocytogenes* utilizzati per l'identificazione del sierotipo di appartenenza

<b>Ceppi <i>L. monocytogenes</i></b>	<b>Provenienza</b>
<i>Lm 1102</i>	locale stagionatura
<i>Lm 1106</i>	locale stagionatura
<i>Lm 1112</i>	locale lavaggio
<i>Lm 1113</i>	locale lavaggio
<i>Lm 1122</i>	locale stoccaggio cella frigo
<i>Lm 1134</i>	locale stagionatura
<i>Lm 1139</i>	locale stagionatura
<i>Lm 1142</i>	locale stagionatura
<i>Lm 1145</i>	locale stagionatura
<i>Lm 1147</i>	locale salatura
<i>Lm 1156</i>	locale confezionamento
<i>Lm 1158</i>	locale confezionamento
<i>Lm 1176</i>	locale salatura
<i>Lm 1184</i>	locale confezionamento
<i>Lm 1196</i>	locale salatura
<i>Lm 1201</i>	locale confezionamento
<i>Lm 1210</i>	locale lavaggio
<i>Lm 1222</i>	locale stoccaggio cella frigo
<i>Lm 1235</i>	locale confezionamento
<i>Lm 1173</i>	locale confezionamento

Gli isolati identificati appartenenti alla specie *L. monocytogenes*, derivanti dalle diverse aree dello stabilimento caseario sottoposte a campionamento, sono stati sottoposti ad una PCR multiplex secondo quanto indicato nel protocollo di Doumith et al. (2004), per la ricerca dei quattro principali sierotipi (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b). Sono stati ricercati i seguenti geni: *lmo0737*, *lmo1118*, *ORF2819* e *ORF2110* e come controllo interno è stato usato il gene *prs*, specifico per il genere *Listeria* (Tabella 3).

Tabella 3 Primers utilizzati nella determinazione del sierotipo

Primer	Sequenza	Prodotto	Concentrazione Primer
<i>lmo 0737</i>	AGGGCTTCAAGGACTTACCC ACGATTCTGCTTGCCATTC	691	1 $\mu$ M
<i>lmo 1118</i>	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA CGGCTTGTCGGCATACTTA	906	1.5 $\mu$ M
<i>ORF2819</i>	AGCAAAATGCCAAAACCTCGT CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471	1 $\mu$ M
<i>ORF 2110</i>	AGTGGACAATTGATTGGTGAA CATCCATCCCTFACTTTGGAC	597	1 $\mu$ M
<i>prs</i>	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG CAAAGAAACCTTGGATTGCGG	370	0.2 $\mu$ M

La reazione di amplificazione con volume finale di 50  $\mu$ l era composta da: buffer PCR 5X (Flexi Buffer Green GoTaq, Promega), 0,2 mM di Dntps mix (10 mM, Sigma), primers *lmo 0737*, *lmo 1118*, *ORF2819*, *ORF 2110*, *prs* alle concentrazioni indicate nella Tabella 3, 2 mM di MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen), 2 U di Taq polimerasi (GOTAQ Hot start 5U/ $\mu$ l, Promega), 5  $\mu$ l di DNA e infine H<sub>2</sub>O milliliq sterile fino al raggiungimento del volume finale.

### Curva di crescita ceppi di *Listeria monocytogenes* appartenenti a diversi sierotipi

Tra i vari ceppi di *L. monocytogenes* derivanti dai campionamenti ambientali ne sono stati selezionati tre appartenenti ai seguenti sierotipi: Lm1102, sierotipo 4b; Lm 1113, sierotipo 1/2b; LM1142, sierotipo 1/2 c; più un ceppo di referenza, NTCC 10887, appartenente al sierotipo 1/2 b.

Per valutare il tempo necessario ai diversi ceppi di *L. monocytogenes* per raggiungere la fase pre-stazionaria di crescita (circa 10<sup>9</sup> UFC/ml), fase alla quale i ceppi vengono utilizzati nei successivi esperimenti di challenge, è stata allestita per ciascuno una curva di crescita a tre temperature di incubazione: 30°C e 4°C, rispettivamente la temperatura ottimale di crescita del patogeno e la temperatura di conservazione del formaggio; 10°C per simulare un non corretto mantenimento della catena del freddo come potenzialmente ipotizzato nella conservazione domestica. A tale scopo i ceppi di *L. monocytogenes*, conservati a – 80°C, sono stati seminati in terreno non selettivo BHA e incubati 24 ore a 37°C. Una singola colonia di ciascun ceppo è stata inoculata in 10 ml di BHI e incubata in agitazione alle diverse temperature di incubazione (30°C, 10°C e 4°C) fino al raggiungimento della fase pre-stazionaria di crescita (circa 10<sup>9</sup> UFC/ml). Infine, a partire da ciascuna soluzione madre, per ciascun tempo definito in base alla temperatura di

incubazione, sono state allestite diluizioni scalari 1:10 in soluzione fisiologica (Na Cl 0,85%) e 1 ml di ciascuna diluizione è stato seminato in BHA. Le piastre sono state incubate 24 ore a 37°C.

Ai rispettivi tempi e temperature di incubazione è stata fatta la conta delle colonie cresciute alle varie diluizioni, prendendo in considerazione solo quelle in cui la carica batterica era tale da consentire la conta delle colonie e stabilire le Unità Formanti Colonia (UFC) per millilitro presenti nel brodo di partenza.

### **Caratterizzazione in vitro dell'attività antilisterica di *L. plantarum***

La caratterizzazione dell'attività antilisterica esercitata dalla coltura liofilizzata di *L. plantarum* è stata svolta in Irlanda presso i laboratori della Teagasc, Agriculture and Food Development Authority, situati a Fermoy Co. Cork durante il periodo di formazione previsto all'estero.

### **Curva di crescita di *Lactobacillus plantarum* (*Listeria Dairy*, Danisco Holdbac)**

La coltura liofilizzata di *L. plantarum* è stata inoculata in Lactobacilli de Man Rogosa Sharpe Broth (MRS broth, BD Difco™), un brodo di crescita selettivo per i lattobacilli, seguendo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice (*Listeria Dairy*, Danisco Holdbac). Ciascuna confezione conteneva una quantità di coltura liofilizzata pari a 100 gr da utilizzare in 100 litri di latte in modo da ottenere una concentrazione di 10 IP (Inhibiting Particules) (Technical Memorandum TM 2064 2e, Danisco). Partendo da questo presupposto è stata calcolata la quantità (in grammi) di coltura liofilizzata da utilizzare in 100 ml di brodo di coltura:

$$100 \text{ gr} : 100 \text{ litri} = 10 \text{ IP}$$

$$1 \text{ gr} : 1 \text{ litro} = 0,1 \text{ IP}$$

$$0,1 \text{ gr} : 100 \text{ ml} = 0,01 \text{ IP}$$

Sono stati quindi pesati 0,1 gr di coltura liofilizzata che è stata successivamente inoculata in un volume finale di 100 ml di MRS broth. Per valutare la carica batterica di partenza, corrispondente a 0,1gr/100 ml (0,01 IP), da questa è stata prelevata un'aliquota (1 ml), corrispondente al tempo zero (T0), che è stata seminata in terreno selettivo per i lattobacilli, MRS agar con l'aggiunta di L-



cisteina (L-Cys, 0,5 g/l) e successivamente incubata over night (O/N) a 30°C in condizione di anaerobiosi.

Dalla restante parte della brodocoltura batterica, dopo incubazione a 30°C per rispettivamente 6 ore (T6), 12 ore (T12) e 18 ore (T18) sono state allestite diluizioni scalari 1:10 in soluzione fisiologica (NaCl 0,85%) e 1 ml di ciascuna diluizione è stato seminato in Modified -MRS (M-MRS, MRS agar addizionato di L-Cysteina 0,5 g/l) e le piastre incubate O/N a 30°C in condizione di anaerobiosi (UNI EN ISO 15214:1998).

Per ciascun tempo di incubazione è stata fatta la conta delle colonie cresciute alle varie diluizioni, prendendo in considerazione solo quelle in cui la carica batterica era tale da consentire la conta delle colonie e stabilire le Unità Formanti Colonia (UFC) per millilitro presenti nel brodo di partenza.

#### **Determinazione dell'attività antimicrobica di *L. plantarum*: ruolo del mezzo di coltura e della temperatura di incubazione**

Per valutare in che modo la coltura liofilizzata commerciale di *L. plantarum* (*Listeria Dairy*, Danisco Holdbac) fosse in grado di esercitare la sua attività antilisterica e per valutare se questa fosse influenzata dal mezzo di coltura nel quale il lattobacillo veniva fatto crescere, sono stati allestiti una serie di esperimenti allo scopo di caratterizzare l'attività antilisterica esercitata dal *L. plantarum*.

Pertanto, la coltura conservata -20°C, prima del suo uso sperimentale è stata risospesa in diversi mezzi di coltura: soluzione fisiologica (NaCl 0,85%), Trypton Soy Broth (TSB BD Difco™) Lactobacilli de Man Rogosa Sharpe Broth (MRS broth, BD Difco™) fino ad ottenere una concentrazione batterica iniziale di circa 10<sup>6</sup> UFC/ml (corrispondente a 0,1 gr di coltura in 100 ml di volume finale), calcolato seguendo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice (Technical Memorandum TM 2064 2e, Danisco).

Quando la coltura liofilizzata di *L. plantarum* è stata risospesa in soluzione fisiologica, è stata utilizzata immediatamente nei saggi di valutazione dell'attività antilisterica, mentre quando sono stati utilizzati come mezzi di crescita il TSB e il MRS broth, la coltura di *L. plantarum*, dopo l'inoculo nei rispettivi brodi di coltura è stata incubata a 30 °C per 18 ore prima del suo uso sperimentale (temperatura e tempo di incubazione che consentono il raggiungimento di una carica batterica pari a 10<sup>9</sup> UFC/ml)

Come ceppi indicatori nei saggi di attività antilisterica sono stati utilizzati tre diversi ceppi di *L. monocytogenes* (provenienti dalla collezione del Dipartimento di IAOA), appartenenti a tre diversi sierotipi (1/2b, 1/2c, 4b), più un ceppo di riferimento appartenente al sierotipo 1/2 b.

Una scorta di tutti i ceppi utilizzati è stata conservata a -80 ° C in brodo BHI (BD Difco™ Brain heart infusion broth) con il 15% di glicerolo. Durante gli esperimenti, i ceppi sono stati seminati su piastre di BHA (BD Difco™ Brain heart infusion agar) e il giorno prima sono stati propagati separatamente in 10 ml ciascuno di brodo BHI e incubati O/N a 30 ° C in agitazione (per far sì che raggiungessero la fase pre-stazionaria di crescita).

Le colture così ottenute di *L. plantarum* e *L. monocytogenes* sono state quindi utilizzate negli esperimenti di Agar Well Diffusion Assay (AWDA) per determinare l'attività antagonista esercitata da *L. plantarum* contro ciascun ceppo patogeno di *L. monocytogenes*.

I ceppi di *L. monocytogenes* (incubati O/N in BHI a 30°C) sono stati utilizzati come ceppo indicatore negli esperimenti di AWDA. Sinteticamente, ciascun ceppo di *L. monocytogenes* è stato incluso in 20 ml di BHA “morbido”, ottenuto aggiungendo al brodo BHI una bassa concentrazione di agar (1%), fino a raggiungere una concentrazione finale del patogeno incluso pari a 10<sup>5</sup> UFC/ml. Ciascun terreno contenente i rispettivi ceppi di *L. monocytogenes* inclusi, è stato colato all'interno di piastre Petri sterili del diametro di 90 mm. È stato creato uno strato sottile e omogeneo di terreno e, dopo aver lasciato solidificare l'agar, sono stati creati una serie di pozzetti del diametro di circa 6 mm, ciascuno dei quali è stato riempito con un'aliquota di 100 µl delle seguenti soluzioni: i) 10<sup>6</sup> UFC/ml di coltura liofilizzata di *L. plantarum* disciolta in soluzione fisiologica (NaCl 0,85%); ii) 10<sup>9</sup> UFC/ml di coltura over night di *L. plantarum* in TSB; iii) 10<sup>9</sup> UFC/ml di coltura over night di *L. plantarum* in MRS broth. Come controlli negativi (NC) sono stati utilizzati 100 µl di soluzione fisiologica (NaCl 0,85%), 100 µl di TSB e 100 µl di MRS broth.

Le piastre ottenute sono state incubate in condizioni di anaerobiosi a 30°C fin quando è stato possibile osservare un'attività antagonistica data dallo sviluppo attorno a ciascun pozzetto di zone chiare di inibizione della crescita dei vari ceppi di *L. monocytogenes* presenti nel terreno. Tale alone di inibizione è stato misurato utilizzando un righello.

## **Caratterizzazione dell'attività antilisterica del surnatante di colture di *L. plantarum***

Per valutare la modalità con la quale la coltura liofilizzata di *L. plantarum* fosse in grado di inibire la crescita dei differenti ceppi di *L. monocytogenes*, dalle colture over night di *L. plantarum* è stato ottenuto un surnatante privo di cellule (CFS, Cell Free Supernatant) che è stato successivamente testato in saggi di diffusione su piastra (AWDA).

### **Preparazione del surnatante privo di cellule (CFS)**

A tale scopo sono stati inoculati 0,1 gr di coltura liofilizzata in 100 ml finali di due diversi brodi di coltura: TSB e MRS broth. Le colture sono state quindi incubate 18 ore a 30°C e successivamente centrifugate a 10.000× g per 10 minuti a 4 °C. Il surnatante è stato raccolto ed è stato regolato il pH, portandolo ad un valore di 6,0, quando necessario. Il CFS ottenuto dalla coltura del *L. plantarum* in MRS broth è stato utilizzato sia tale quale in seguito a centrifugazione e filtrazione, con un pH di 3,9, sia in seguito alla correzione del pH fino ad un valore di 6,0. Questo passaggio è stato eseguito per escludere che l'attività antilisterica fosse dovuta all'acidità del mezzo e non alla presenza di molecole antimicrobiche rilasciate nel surnatante dal *L. plantarum*. Il CFS ottenuto dalla coltura del *L. plantarum* in TSB è stato utilizzato tale quale in quanto il pH della coltura aveva un valore intorno a 6,0, pertanto, non è stato necessario modificarlo.

Il surnatante è stato infine ulteriormente privato di cellule e residui mediante l'utilizzo di un filtro con pori del diametro di 0,22 µm (Millipore Corporation, Bedford, Stati Uniti).

Il surnatante privato di cellule (CFS), ottenuto dalle colture di *L. plantarum* in MRS broth e TSB, è stato quindi utilizzato nei test di AWDA dove è stato messo a contatto con i differenti ceppi di *L. monocytogenes* selezionati come indicatori: Lm 1102, Lm 1113, Lm 1142 e NTCC 10887 e incubato alle seguenti temperature: 30°C, 10° C e 4°C (rispettivamente la temperatura ottimale di crescita del patogeno, temperatura di un non corretto mantenimento della catena del freddo e la temperatura di conservazione del formaggio). Le piastre del AWDA sono state incubate per tempi diversi alle tre temperature in modo tale da creare le condizioni

per l'ottimale sviluppo dei ceppi indicatori e per consentire la misurazione dell'alone di inibizione, dove presente.

### **Inibizione dell'attività del surnatante ottenuto da colture di *L. plantarum* in seguito al trattamento con proteasi**

Per capire se l'attività antimicrobica esercitata dal surnatante fosse determinata dalla presenza di un composto proteico rilasciato dal *L. plantarum*, il CFS è stato trattato con enzimi proteolitici in grado di neutralizzare l'attività e inibire l'attività antilisterica. Pertanto, il CFS, ottenuto da colture over night a 30°C di *L. plantarum*, inoculato in terreno MRS broth (alla concentrazione di 0,1 g/100ml), è stato trattato separatamente con: proteinasi K (33 U mg<sup>-1</sup>) e tripsina (105 U mg<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich Corporation, USA). Nello specifico, un'aliquota del CFS (2 ml) è stato addizionato con i rispettivi enzimi proteolitici utilizzati ad una concentrazione di 2 mg/ml. Ciascun CFS è stato incubato a 37 ° C per 3 ore e la reazione è stata quindi interrotta portando il CFS a 95 °C per 5 minuti.

Il surnatante (CFS) così trattato è stato testato in saggi di Agar Well Diffusion Assay (AWDA) come descritto sopra, utilizzando come ceppi indicatori dell'attività antilisterica i ceppi selezionati per gli esperimenti precedenti: Lm 1102, Lm 1113, Lm 1142 e NTCC 10887. Le piastre sono state incubate a diverse temperature: 30°C, 10°C e 4°C.

### **Analisi di spettrometria di massa per l'identificazione del composto ad attività antilisterica prodotto da *L. plantarum***

Per avere un'indicazione sul composto o sui composti responsabili dell'attività antilisterica esercitata da *L. plantarum*, la coltura è stata utilizzata, sotto la supervisione della Dott.ssa Paula O'Connor, presso i laboratori della Teagasc, per la purificazione e successiva analisi mediante HPLC. La coltura di *L. plantarum* è stata preparata come segue: 0,1gr della coltura liofilizzata è stata risospesa in 100 ml di NaCl (0,85%), seminata su di una piastra di M-MRS (MRS agar addizionato di L-Cysteina 0,5 g/l) e incubata 24 ore a 30°C in anaerobiosi; una singola colonia è stata quindi risospesa in 10 ml di TSB (Trypton Soy Broth) e nuovamente incubata a 30°C per 24 ore; il brodo di coltura è stato espanso fino ad ottenere un volume finale di 1 litro. La coltura di *L. plantarum*, in fase stazionaria di crescita è stata consegnata per le successive prove di purificazione e analisi mediante HPLC. La

coltura è stata preliminarmente centrifugata a 8000 giri per 20 minuti e le cellule sono state separate dal surnatante. Il pellet cellulare è stato miscelato con 250 ml di propanolo 0,1% TFA (IPA) e mescolato a temperatura ambiente per 3-4 ore. L'estratto cellulare è stato centrifugato come descritto sopra e il surnatante cellulare trattenuto per la purificazione.

#### **Analisi dell'estratto cellulare di *L. plantarum*: purificazione**

L'estratto cellulare, ottenuto in seguito alla rimozione del propanolo 0,1% TFA (IPA, Alcool Isopropilico), è stato addizionato ad una colonna Strata® C18-E SPE (Phenomenex, Cheshire, UK) pre-equilibrata con metanolo e acqua. La colonna è stata lavata con 20 ml di etanolo al 30% e successivamente eluita con IPA al 70%. L'attività antimicrobica dei composti ottenuti (dal lavaggio con etanolo e dall'eluato con IPA) è stata testata su piastra utilizzando come ceppo indicatore *L. monocytogenes*.

#### **Analisi HPLC dell'estratto cellulare purificato**

L'IPA è stato rimosso dall'eluato ottenuto dalla purificazione in colonna Strata® C18-E SPE (Phenomenex, Cheshire, UK) e addizionato ad una colonna RP-HPLC semi preparativa Jupiter Proteo (10 x 250 mm, 90Å, 4µ) (Phenomenex, Cheshire, UK). L'eluente è stato monitorato a 214 nm e le frazioni sono state raccolte a intervalli di 1 minuto.

#### **Analisi del surnatante di *L. plantarum*: purificazione**

Il surnatante ottenuto dalla coltura di *L. plantarum* è stato addizionato all'interno di una colonna Econo contenente biglie di Amberlite® XAD16N (Phenomenex, Cheshire, UK) precedentemente lavata con acqua Milli Q. La colonna è stata quindi lavata con 250 ml di etanolo al 30% e 250 ml di propanolo 0,1% TFA (IPA). Le frazioni purificate sono state testate su piastra utilizzando come ceppo indicatore *L. monocytogenes*.

Il campione ottenuto dalla purificazione colonna Econo contenente biglie di Amberlite® XAD16N (Phenomenex, Cheshire, UK) è stato ulteriormente purificato all'interno di una colonna Strata® C18-E SPE (Phenomenex, Cheshire, UK). Pertanto, l'IPA è stato rimosso dall'eluato ottenuto dalla purificazione in XAD16N e il campione è stato addizionato all'interno di una colonna Strata® C18-

E SPE (Phenomenex, Cheshire, UK) pre – equilibrata con metanolo e acqua. La colonna è stata quindi lavata con etanolo al 30% e successivamente con IPA al 70%. L'attività inibitoria dei prodotti derivanti dalla purificazione, il flusso attraverso la colonna (FT), la soluzione di lavaggio con etanolo al 30% e il composto eluito in IPA, è stata testata su piastra utilizzando come ceppo indicatore *L. monocytogenes*.

#### **Analisi HPLC del surnatante purificato in colonna Strata® C18-E SPE (Phenomenex, Cheshire, UK)**

L'IPA è stato rimosso dall'eluato ottenuto dalla purificazione in C18-E SPE (Phenomenex, Cheshire, UK) e addizionato all'interno di una colonna RP-HPLC semi preparativa Jupiter Proteo (10 x 250 mm, 90Å, 4µ) (Phenomenex, Cheshire, UK). L'eluente è stato monitorato a 214 nm e le frazioni sono state raccolte a intervalli di 1 minuto. L'attività inibitoria di ciascuna è stata testata su piastra utilizzando come ceppo indicatore *L. monocytogenes*.

Le frazioni che presentavano una maggiore attività antilisterica (30-33) sono state raggruppate e concentrate per essere nuovamente analizzate sulla colonna HPLC. Le frazioni sono state raccolte a intervalli di 30 secondi.

#### **Analisi molecolare del genoma di *L. plantarum* per la ricerca dei geni correlati alla pediocina**

Per consolidare la teoria emersa dall'analisi del surnatante prodotto da *L. plantarum*, secondo cui la coltura sarebbe in grado di produrre e liberare una sostanza di natura proteica con attività antilisterica, correlata alla batteriocina Pediocina, è stata condotta un'indagine molecolare sugli isolati ottenuti dalla coltura liofilizzata di *L. plantarum* allo scopo di individuare, se presenti, i geni responsabili della produzione di tale molecola.

A tale scopo la coltura liofilizzata di *L. plantarum* è stata preliminarmente incubata in un brodo di coltura, costituito da MRS broth (0,1g di coltura in 100 ml di terreno) e incubata per 18 ore a 30°C. Successivamente un'aliquota della sospensione batterica è stata seminata su MRS agar con L- Cys (0,5 g/L) e incubata in anaerobiosi a 37°C per 24 ore.

Dalle colonie cresciute su piastra è stato quindi estratto il DNA utilizzando il kit di purificazione DNeasy Ultraclean (Qiagen). Come controllo positivo è stato utilizzato il DNA estratto da una coltura di *Pediococcus spp.* produttore di

pediocina (APC 3876 IMG 27351, fornito dalla collezione cellulare interna del laboratorio di Colture Cellulari Teagasc). In seguito all'estrazione è stata misurata la concentrazione del DNA mediante l'ausilio di un Nanodrop (Nanodrop 1000, Thermofisher).

Sulla base delle sequenze note del *locus* dei geni codificanti per la Pediocina, la PCR è stata messa a punto utilizzando una coppia di primers specifici ottenuti da regioni conservate (D. Suwanjinda et al. 2007) elencati nella Tabella 4.

La reazione di amplificazione prevedeva un volume finale di 50 µl contenente: master mix JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ 1X (Sigma-Aldrich), i primers *Ped F* e *Ped R* le cui concentrazioni sono indicate in Tabella 4, template DNA 1-200 ng, ed infine H<sub>2</sub>O milliQ sterile fino al raggiungimento del volume finale. Il profilo termico utilizzato era il seguente:

<i>Fase</i>	<i>N. cicli</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>
<i>Pre- incubazione</i>	1	94°C	5 min
<i>Denaturazione</i>		94°C	1 min
<i>Annealing</i>	30	55°C	30 sec
<i>Estensione</i>		72°C	45 sec
<i>Incubazione finale</i>	1	72°C	5 min

Il prodotto di amplificazione è stato sottoposto a elettroforesi in gel di agarosio all'1,5% (p/v) in 1X TBE (Tris borato-EDTA), visualizzato mediante l'impiego del sistema Gel-Doc UV trans illuminator (Bio-Rad, USA) e le immagini elaborate con il software Quantity-One (Bio-Rad, USA).

Tabella 4 Sequenze dei primers utilizzati per l'amplificazione dei geni codificanti per la Pediocina

<i>Gene</i>	<i>Primers</i>	<i>Sequenza</i>	<i>Prodotto (bp)</i>	<i>Concentrazione primer</i>
Pediocina	<i>Ped F</i>	5'-GGTAAGGCTACCACTTGCAT-3'	332	0,4µM
	<i>Ped R</i>	5'-CTACTAACGCTTGGCTGGCA-3'		0,4µM

### **Caratterizzazione in vivo dell'attività antilisterica di *L. plantarum***

Dopo aver acquisito le informazioni preliminari riguardo il meccanismo con il quale *L. plantarum* esercita la propria attività antilisterica, si è valutato in che modo tale

coltura potesse essere utilizzata in vivo per inibire la contaminazione da *L. monocytogenes* del formaggio fresco ovino Primo Sale.

### **Curva di crescita di *L. plantarum* in differenti matrici: latte ovino pastorizzato, siero di latte, scotta**

Per identificare la matrice ideale per la creazione di una coltura madre di *L. plantarum* capace di produrre concentrazioni efficaci di Pediocina sono state messe a punto delle curve di crescita di *L. plantarum* in tre matrici differenti: latte ovino, siero di latte ovino e scotta. Tali substrati di crescita sono stati forniti dallo stabilimento caseario F.lli Pinna nel quale viene prodotto il formaggio Primo Sale. Nello specifico tre bottiglie da 1 litro di ciascun materiale sono state portate a 37°C mediante l'ausilio di un bagnetto termostato.

Da ciascun campione (latte, siero e scotta) è stata preliminarmente prelevata un'aliquota (1 ml), corrispondente al campione T0 pre - inoculo, che è stata seminata in MRS agar e incubata in anaerobiosi a 30°C per 24/ 48 ore.

A questo punto, in ciascun brodo mantenuto ad una temperatura costante di 37°C, è stata inoculata la coltura liofilizzata di *L. plantarum* seguendo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice (*Listeria Dairy*, Danisco Holdbac), in modo da ottenere una concentrazione di partenza presunta pari a circa 10<sup>6</sup> UFC/ml. Pertanto, è stato pesato 1 g della coltura liofilizzata ed è stato aggiunto ad 1 litro delle rispettive matrici di crescita; è stato omogenizzato il contenuto ed è stata prelevata da ciascuno un'aliquota (1 ml), corrispondente al campione T0 post- inoculo, che è stata seminata in MRS agar e incubata in anaerobiosi a 30°C per 24/ 48 ore. Lo stesso procedimento è stato ripetuto per il latte ovino dopo ogni ora di incubazione, fino ad arrivare al T10 (10 ore dopo l'inoculo), tempo dopo il quale si notavano delle alterazioni della matrice utilizzata (presenza di coaguli). Mentre per il siero e la scotta è stata prelevata un'aliquota (1 ml) per la semina in MRS agar ai seguenti tempi: dopo 8 ore di incubazione (T8); dopo 9 ore (T9); dopo 10 ore (T10); dopo 11 ore (T11); dopo 12 ore dall'inoculo (T12). Contestualmente si è proceduto alla valutazione della curva di acidificazione (pH) delle varie matrici utilizzate, dopo l'inoculo di *L. plantarum* e alla temperatura di 37°C.



### **Preparazione della coltura madre di *L. plantarum* in scotta**

Dopo aver elaborato i dati ottenuti dalle prove di laboratorio eseguite su latte ovino, siero di latte ovino e scotta, si è deciso di utilizzare la scotta come matrice ideale per la crescita di *L. plantarum*, da utilizzare in caseificio per creare una coltura madre da inserire nel latte al momento della lavorazione del formaggio Primo Sale. La scotta innesto è stata preparata dagli operatori del caseificio in maniera da poterla utilizzare in tre giornate di lavorazione differenti. Per la preparazione della scotta innesto è stato utilizzato 1 g di *L. plantarum* per ogni litro di scotta. La scotta con il *L. plantarum* è stata tenuta a 37°C per 12 ore prima del suo utilizzo. In ogni polivalente, della portata di circa 3500 litri, sono stati quindi aggiunti 30 litri di scotta innesto.

### **Campionamento e analisi dei parametri chimici e microbiologici**

Durante ognuna delle tre giornate di lavorazione (una per ciascun lotto campionato) sono state predisposte due polivalenti per la lavorazione di due differenti preparazioni:

- una per il Primo Sale con l'aggiunta della scotta innesto contenete il *L. plantarum*;
- una per il Primo Sale senza la scotta innesto.

Per ognuna delle due preparazioni sono stati prelevati i seguenti campioni:

- 300 g di cagliata subito dopo la rottura, da dividere in tre aliquote di 100 g ciascuna;
- un campione da 500 ml di scotta innesto prima dell'inoculo in polivalente, che è stato diviso in tre aliquote da circa 150 ml ciascuna.

Contemporaneamente al prelievo dei campioni, sono stati rilevati i seguenti parametri:

- temperatura e pH della cagliata subito dopo la rottura, per ognuna delle due preparazioni;
- temperatura e pH della scotta innesto, prima dell'inoculo in polivalente.

I campioni prelevati sono stati trasportati, alla temperatura di 4°C, presso la facoltà di Medicina Veterinaria di Sassari, settore di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale. Presso i laboratori i campioni sono stati trattati per allestire la semina in

MRS, da incubare a 30°C in modo da valutare la crescita dei lattobacilli, compreso *L. plantarum* (UNI EN ISO 15214:1998).

Il giorno successivo a quello della lavorazione di ogni lotto di produzione del Primo Sale, sono stati prelevati, presso il caseificio, i campioni della cagliata prima del trasferimento in salamoia per tutte e due le preparazioni campionate il giorno precedente:

- 300g di cagliata di Primo Sale, preparato con l'aggiunta della scotta innesto;
- 300g di cagliata di Primo Sale, preparato senza l'aggiunta della scotta innesto.

In contemporanea sono stati rilevati, per ogni campione prelevato, il pH e la temperatura.

I campioni sono stati trasportati, alla temperatura di 4°C, presso i laboratori della sezione di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale e utilizzati per allestire la semina in MRS agar, da incubare a 30°C in modo da valutare la crescita dei lattobacilli, compreso *L. plantarum*.

### **Challenge test primo sale**

#### **Piano di campionamento**

Presso il caseificio, successivamente alla produzione dei campioni, per ciascuno dei tre lotti di lavorazione di primo Sale si è proceduto allo stoccaggio delle forme identificate:

- n.15 forme di Primo Sale, preparato con la scotta innesto;
- n.15 forme di Primo Sale, preparato senza la scotta innesto;

Le forme sono state confezionate sottovuoto e trasportate presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria, e conservate a 4°C, in attesa di essere utilizzate per le successive prove di laboratorio.

Il piano di campionamento prevedeva che per ciascun lotto di produzione venissero campionate 6 forme come segue: per ciascun lotto di produzione 3 forme addizionate con la scotta innesto contenente la coltura protettiva e 3 forme senza l'innesto della coltura protettiva da utilizzare come campione di controllo per l'andamento della contaminazione da *L. monocytogenes*. Successivamente ogni forma veniva porzionata e gli spicchi che costituivano i controlli negativi venivano confezionati sottovuoto e trasferiti alle due temperature di stoccaggio: 4°C e 10°C. Le restanti porzioni venivano sottoposte al successivo inoculo sperimentale con un

mix di ceppi di *L. monocytogenes* (gli stessi utilizzati nelle prove *in vitro*, appartenenti ai diversi sierotipi) per simulare una contaminazione post processo. I campioni sottoposti a contaminazione sperimentale venivano poi stoccati a due differenti temperature, la prima a 4°C per simulare lo stoccaggio corretto e la seconda a 10°C per simulare un non corretto mantenimento della catena del freddo come potenzialmente ipotizzato nella conservazione domestica. Pertanto, le forme destinate al challenge test venivano divise in 8 spicchi:

- n.2 spicchi da analizzare a T0 (cioè il giorno successivo a quello della contaminazione con *L. monocytogenes* e al successivo confezionamento sottovuoto) uno da stoccare a 4°C e uno a 10°C;
- n.2 spicchi da analizzare a T1 (cioè dopo 20 giorni, corrispondenti alla shelf life del prodotto, dalla produzione e dalla contaminazione con *L. monocytogenes* e al confezionamento sottovuoto), uno da stoccare a 4°C e uno a 10°C;
- n.4 spicchi, utilizzati come controlli negativi, non sottoposti a contaminazione con *L. monocytogenes*, da analizzare a T0 e T1, due da stoccare a 4°C e due a 10°C.

### **Preparazione dell'inoculo sperimentale**

Gli spicchi ottenuti dalle forme porzionate di Primo Sale sono stati contaminati con un inoculo costituito da una diluizione ottenuta con quattro ceppi di *L. monocytogenes*. Il mix di ceppi era costituito da tre ceppi isolati precedentemente dall'ambiente di lavorazione del caseificio (Lm 1102, Lm 1113, Lm 1142, appartenenti rispettivamente ai sierotipi 4 b, ½ b, ½ c) mentre il quarto ceppo apparteneva alla collezione del Dipartimento ed era un ceppo di riferimento (Lm NTCT 10887 appartenente al sierotipo ½ b).

Si è proceduto come segue: i ceppi venivano rivitalizzati su appositi terreni di coltura, inizialmente seminati su BHA e successivamente una singola colonia di ciascuno era inoculata in 10 ml di BHI broth, incubato over night a 30°C in agitazione. A questo punto, i quattro brodi erano uniti per ottenere un pool dei ceppi di *L. monocytogenes*. Il brodo di coltura era lasciato alla temperatura di 4°C per effettuare l'adattamento, e successivamente veniva valutata la crescita e il raggiungimento della fase pre-stazionaria ( $10^9$  UFC/ml). Venivano fatte delle diluizioni scalari 1:10 del pool di partenza che era utilizzato alla concentrazione utile per l'inoculo sugli spicchi (circa  $10^2$  UFC/ml).

### **Preparazione dei campioni**

Successivamente, si procedeva alla contaminazione superficiale degli spicchi, ad eccezione dei controlli, i quali una volta porzionati venivano confezionati sottovuoto e trasferiti alle due temperature di stoccaggio: 4°C e 10°C. I restanti spicchi venivano posizionati sotto cappa sterile a flusso laminare, dove in sicurezza si procedeva alla contaminazione della superficie di taglio della pasta mediante l'ausilio di spatole sterili. Questa metodica aveva lo scopo di simulare la contaminazione da trascinamento eventualmente causata dalla lama di taglio della porzionatrice. Dopo la contaminazione, ogni spicchio veniva confezionato sottovuoto, adeguatamente identificato e trasferito in cella frigo: una parte degli spicchi a 4°C e una parte a 10°C, come indicato precedentemente.

### **Determinazione dei batteri lattici e analisi quantitativa e qualitativa di**

#### ***Listeria monocytogenes***

La fase sperimentale successiva prevedeva la determinazione dei batteri lattici (MRS a 30°C in anaerobiosi) e del livello di contaminazione da *Listeria monocytogenes* con metodica qualitativa e quantitativa (rispettivamente UNI EN ISO 15214:1998; UNI EN ISO 11290-1: 2017 e UNI EN ISO 11290-2: 2017) su tutti i campioni di Primo Sale a T0 e a T1. Pertanto, da ogni spicchio veniva prelevata un'aliquota campionaria ottenuta raschiando 10 g di prodotto dalla superficie di taglio della pasta. Successivamente ogni campione veniva diluito e seminato in MRS (incubazione a 30°C in anaerobiosi per 48 ore) e in ALOA per la metodica quantitativa e qualitativa (incubazione a 37°C per 24-48h).

Su tutti i campioni analizzati si è proceduto alla valutazione del pH e dell' $a_w$ .

## RISULTATI

### Campionamento Primo Sale

La fase del progetto da svolgere presso lo stabilimento caseario F.lli Pinna s.p.a. prevedeva la valutazione delle diverse fasi tecnologiche di produzione e dei parametri di processo e di prodotto che potevano influire sulla sicurezza del prodotto stesso. A tale scopo sono stati valutati i parametri chimico fisici e microbiologici del prodotto caseario al fine di stabilire se lo stesso fosse in grado di supportare la crescita del patogeno *Listeria monocytogenes*, secondo i criteri stabiliti nel Reg. CE 2073/2005.

Il campionamento, eseguito su tre lotti di produzione del formaggio fresco ovino “Primo Sale”, ha portato all’analisi dei seguenti campioni:

- 100 ml di siero, raccolto in seguito alla rottura della cagliata;
- 300 gr di cagliata, raccolta in seguito allo scarico dalla polivalente all’interno delle forme (cagliata pre- salamoia);
- 300 gr di primo Sale, raccolto da 3 forme diverse, dopo 6 ore di salamoia, prima dello stoccaggio delle stesse a 4°C (cagliata post-salamoia).

### Analisi parametri chimici: pH e $a_w$

I dati ottenuti dall’analisi dei parametri chimici, pH e  $a_w$  dei rispettivi campioni, per i tre lotti analizzati sono riportati in Tabella 5.

*Tabella 5 Analisi di pH e  $a_w$  dei campioni derivanti da tre lotti di produzione del Primo Sale*

Campione	Lotto	pH 1	pH 2	$a_w$ 1	$a_w$ 2
SIERO	I	6,42	6,46		
CAGLIATA PRE-SALAMOIA	I	6,69	6,68	0,992	0,995
CAGLIATA POST-SALAMOIA	I	5,63	5,59	0,990	0,993
SIERO	II	6,53	6,54		
CAGLIATA PRE-SALAMOIA	II	6,79	6,82	0,988	0,990
CAGLIATA POST-SALAMOIA	II	5,44	5,44	0,985	0,987
SIERO	III	6,47	6,46		
CAGLIATA PRE-SALAMOIA	III	6,72	6,73	0,989	0,991
CAGLIATA POST-SALAMOIA	III	5,56	5,56	0,985	0,989

### **Analisi microbiologica: ricerca di *Listeria monocytogenes* e *Listeria spp.***

I campioni di cagliata pre-salamoia e post- salamoia sono stati contestualmente utilizzati per l'analisi microbiologica secondo metodica qualitativa UNI EN ISO 11290-1:2017, con lo scopo di valutare il livello di contaminazione del prodotto da *L. monocytogenes* e *Listeria spp.*

I ceppi ottenuti (25 in totale), con caratteristiche di crescita tipiche, riferibili a *Listeria spp.* e *L. monocytogenes* conservati ad una temperatura di -80° C in Brain Hearth Infusion broth (BHib, Biolife, Italia) contenente glicerolo al 20% sono stati successivamente utilizzati per l'identificazione molecolare di specie mediante multiplex PCR (sviluppata secondo il protocollo descritto da Ryu et al. 2013). Da tale analisi è emerso che tutte le colonie isolate a partire dai campioni raccolti durante la produzione del Primo Sale, erano tutte appartenenti alla specie *Listeria innocua* (Figura 5).

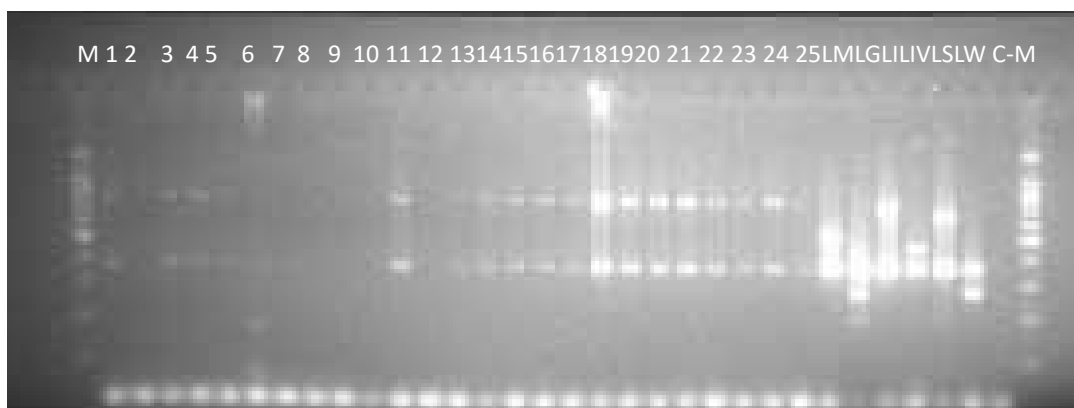


Figura 5 Risultati identificazione molecolare ceppi isolati dai campioni raccolti durante la produzione del Primo Sale. M: marker 100 bp; 1-25: ceppi di *Listeria spp.* isolati; Controlli: LM *L. monocytogenes*; LG *L. grayi*; LI *L. innocua*; LIV *L. ivanovii*; LS *L. seelingeri*; LW *L. welshimeri*; C-: CN.

### **Rilevazione e mappatura dei siti di contaminazione da *Listeria monocytogenes* negli ambienti di produzione**

Per valutazione il rischio di contaminazione del prodotto Primo Sale da *L. monocytogenes* è stato predisposto un programma di mappatura per individuare i potenziali siti di contaminazione presenti negli ambienti di lavorazione dello stabilimento caseario. Sono state individuate cinque aree:

1. Locale di salatura;
2. Locale stagionatura;
3. Locale lavaggio forme;

4. Locale stoccaggio (cella frigo 4°C);
5. Locale confezionamento.

I campionamenti ambientali sono stati ripetuti settimanalmente per un totale di otto settimane, mediante l'ausilio di sponge sterili pre-inumidite (3M, St. Paul, Minnesota, USA). In ciascun locale il campionamento è stato eseguito prelevando il materiale presente sulla superficie e all'interno delle rispettive canalette di scolo e le sponge impregnate del materiale campionato sono state quindi riposte all'interno di un sacchetto sterile e trasportate presso la Facoltà di Medicina Veterinaria di Sassari, settore di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale (IAOA) per le successive analisi.

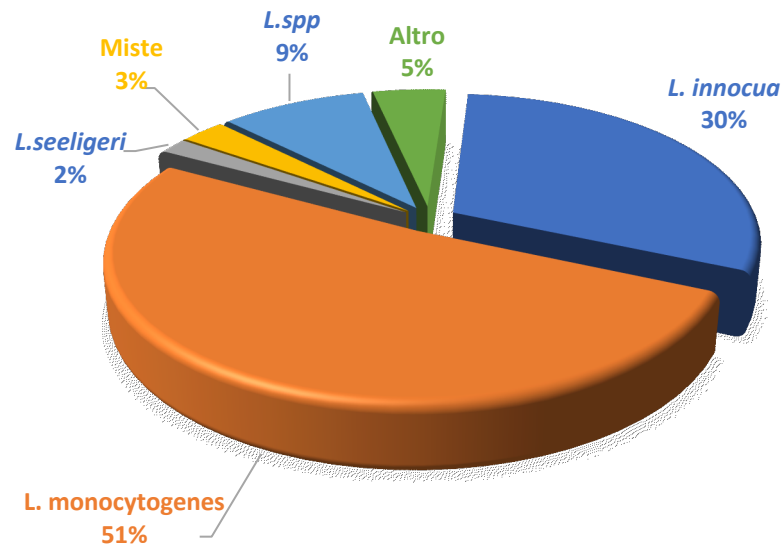
#### **Analisi microbiologica dei campioni ambientali: ricerca di *Listeria monocytogenes* e identificazione molecolare degli isolati mediante multiplex PCR**

Su tutte le sponge ambientali campionate (10 a settimana per un totale di 80 campioni) è stata eseguita la ricerca di *L. monocytogenes* utilizzando le metodiche per la rilevazione qualitativa del microrganismo previste dai protocolli d'analisi UNI EN ISO 11290-01:2017.

I ceppi con caratteristiche di crescita tipiche, riferibili a *L. monocytogenes*, mantenuti ad una temperatura di -80° C in Brain Heart Infusion broth (BHIB, Biolife, Italia) contenente glicerolo al 20% sono stati utilizzati nelle successive analisi molecolari.

I ceppi ottenuti, in totale 286, sono stati sottoposti all'identificazione molecolare di specie mediante multiplex PCR (Ryu et al. 2013). I risultati ottenuti mostrano come delle 286 colonie con caratteristiche di crescita tipiche, riferibili a *L. monocytogenes* e *Listeria spp*, 147 (51%) appartenevano alla specie *L. monocytogenes*; 87 (30%) a *Listeria innocua*; 26 (9%) appartenevano al genere *Listeria* ma non è stato possibile identificarne la specie di appartenenza; 13 (5%) non appartenevano al genere *Listeria*; 8 (3%) erano colonie miste nelle quali erano presenti sia ceppi di *L. monocytogenes* sia di *Listeria innocua* e infine 5 (2%) erano ceppi di *L. seeligeri* (Figura 6).

Figura 6 Risultati identificazione molecolare dei ceppi selezionati dal campionamento ambientale dei locali dello stabilimento caseario



### **Determinazione del sierotipo di appartenenza dei ceppi di *Listeria monocytogenes***

Una selezione dei ceppi di *L. monocytogenes* (20 in totale) derivanti da diverse aree dei locali dell'industria casearia F.lli Pinna di Thiesi sottoposte a campionamento ambientale (Tabella 6) sono stati analizzati mediante una PCR multiplex secondo quanto indicato nel protocollo di Doumith et al. (2004), per la ricerca dei quattro principali sierotipi (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b).

I risultati mostrano che dei 20 ceppi di *L. monocytogenes* isolati: 10 (50%) appartenevano al sierotipo 4 b; 8 (40%) al sierotipo 1/2b e 2 (10%) al sierotipo 1/2 c (Figura 7,8).



Figura 7 Sierotipi prevalenti dei ceppi di *L. monocytogenes* isolati dal campionamento ambientale caseificio

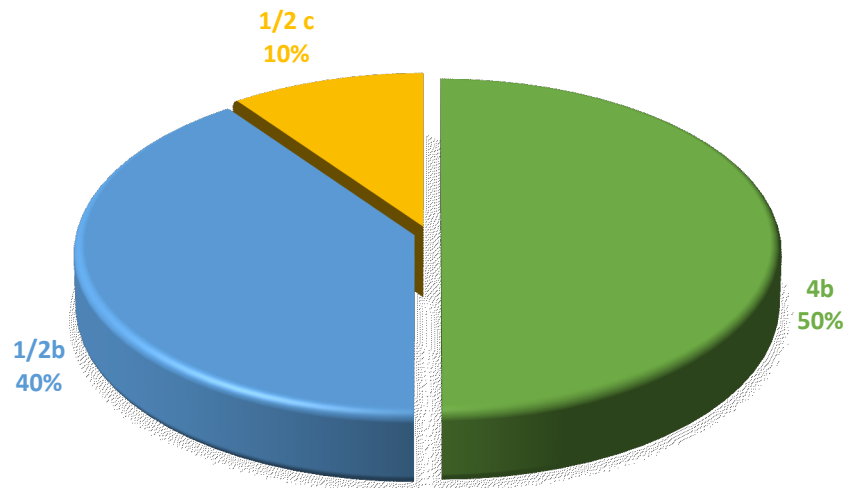


Figura 8: M1Kb : marker; Campioni 1-25 *Listeria innocua*; K+ : LM: *L. monocytogenes*; LG: *L. grayi*; LI: *L. innocua*; LIV: *L. ivanovii*; LS: *L. seelingeri*; LW: *L. welshimeri*.

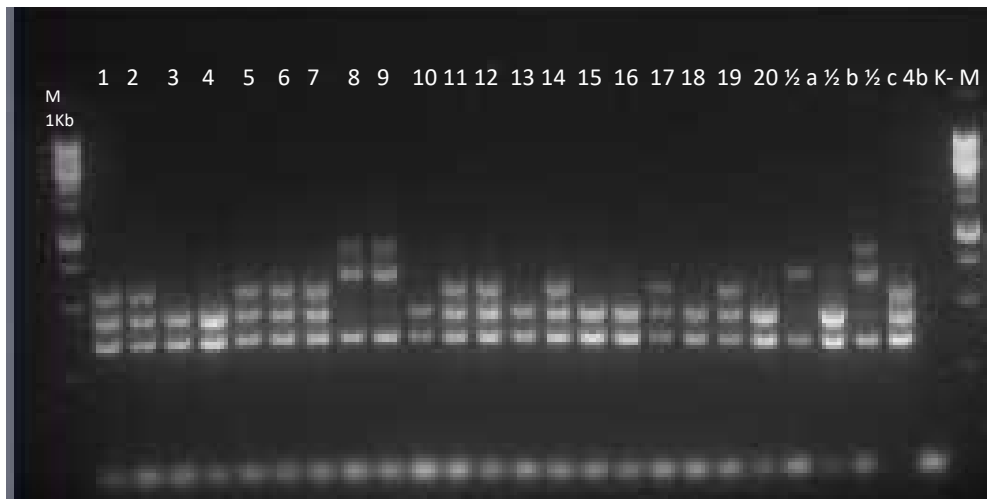


Tabella 6 Elenco dei ceppi ambientali di *L. monocytogenes*, locale di provenienza e rispettivo sierotipo di appartenenza.

Ceppi <i>Listeria monocytogenes</i>	Provenienza	Sierotipo
Lm 1102	locale stagionatura	4b
Lm 1106	locale stagionatura	
Lm 1122	locale stoccaggio cella frigo	
Lm 1134	locale stagionatura	
Lm 1139	locale stagionatura	
Lm 1156	locale confezionamento	
Lm 1158	locale confezionamento	
Lm 1184	locale confezionamento	
Lm 1210	locale lavaggio	
Lm 1235	locale confezionamento	
Lm 1112	locale lavaggio	
Lm 1113	locale lavaggio	
Lm 1147	locale salatura	
Lm 1176	locale salatura	
Lm 1196	locale salatura	
Lm 1201	locale confezionamento	
Lm 1222	locale stoccaggio cella frigo	
Lm 1173	locale confezionamento	
Lm 1142	locale stagionatura	1/2 c
Lm 1145	locale stagionatura	

### Curva di crescita ceppi di *Listeria monocytogenes* a diverse temperature di incubazione

Tra i vari ceppi di *L. monocytogenes* derivanti dai campionamenti ambientali ne sono stati selezionati tre appartenenti ai seguenti sierotipi: Lm1102, sierotipo 4b; Lm 1113, sierotipo 1/2 b; Lm1 142, sierotipo 1/2 c; più un ceppo di riferimento, NTCC 10887, appartenente al sierotipo 1/2 b.

Per valutare il tempo necessario ai diversi ceppi di *L. monocytogenes* per raggiungere la fase pre-stazionaria di crescita (circa  $10^9$  UFC/ml), fase alla quale i ceppi vengono utilizzati nei successivi esperimenti di challenge, è stata allestita per ciascuno una curva di crescita a tre temperature di incubazione: 30°C e 4°C, rispettivamente la temperatura ottimale di crescita del patogeno e la temperatura di conservazione del formaggio; 10°C per simulare un non corretto mantenimento della catena del freddo come potenzialmente ipotizzato nella conservazione

domestica. È evidente come a seconda della temperatura di incubazione le colture dei ceppi di *L. monocytogenes* abbiano raggiunto la fase pre-stazionaria di crescita ( $10^9$  UFC/ml) in tempi diversi. Al tempo zero (T0) la carica batterica iniziale di tutti e quattro i ceppi era di circa  $10^2$  UFC/ml. I risultati ottenuti mostrano come alla temperatura di  $30^\circ\text{C}$  tutti i ceppi raggiungano una carica batterica di  $10^9$  UFC/ml dopo 20 ore di incubazione, a  $10^\circ\text{C}$  il tempo necessario si allunga fino a nove giorni (216 ore) e a  $4^\circ\text{C}$  la fase pre- stazionaria di crescita arriva dopo circa 22 giorni di incubazione (528 ore) (Figure 9, 10, 11).

Figure 9 Curva di crescita dei ceppi di *L. monocytogenes* Lm1102, Lm 1113, Lm 1142, NCTC 10887 incubati a  $30^\circ\text{C}$

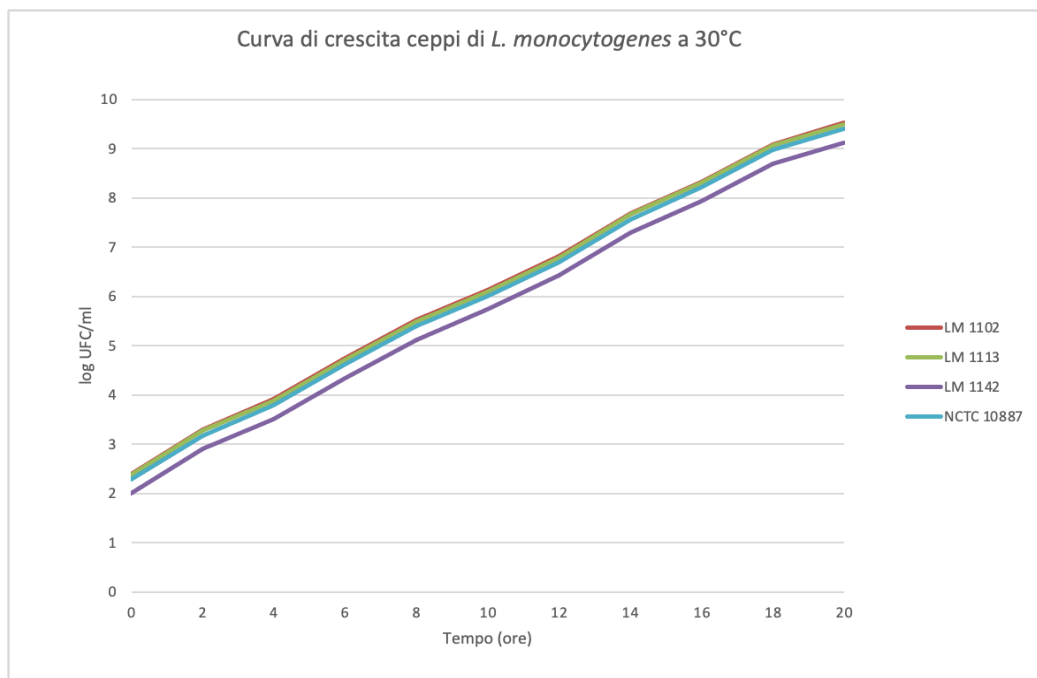


Figure 10 Curva di crescita dei ceppi di *L. monocytogenes* Lm1102, Lm 1113, Lm 1142, NCTC 10887 incubati a 10°C

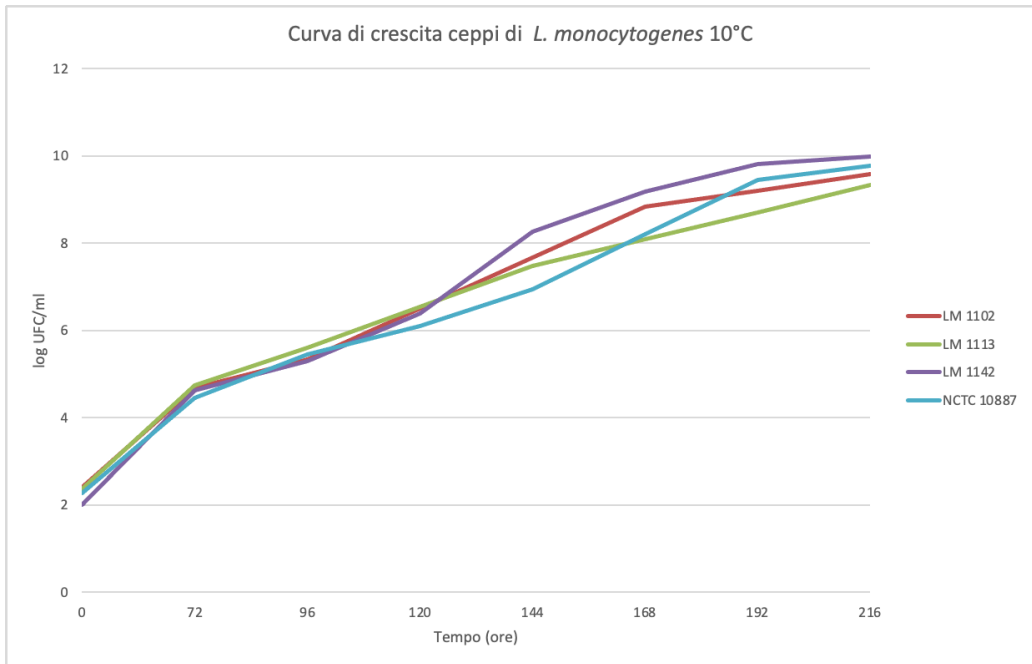
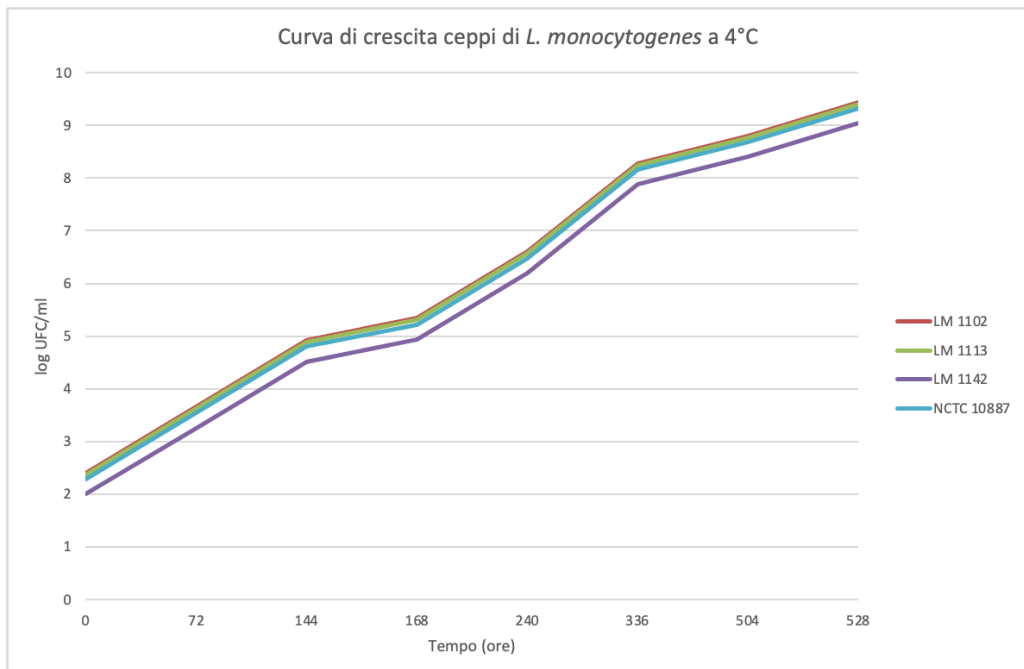


Figure 11 Curva di crescita dei ceppi di *L. monocytogenes* Lm1102, Lm 1113, Lm 1142, NCTC 10887 incubati a 4°C



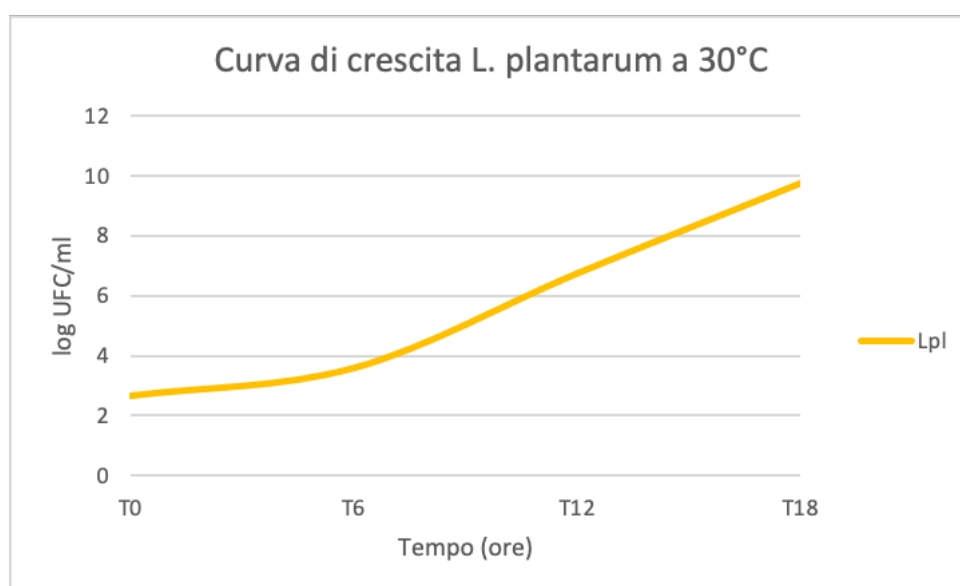
### **Caratterizzazione in vitro dell'attività antilisterica di *L. plantarum***

Per valutare in che modo la coltura liofilizzata commerciale di *Lactobacillus plantarum* (*Listeria Dairy*, Danisco Holdbac) fosse in grado di inibire la sua attività antilisterica, sono stati allestiti una serie di esperimenti allo scopo di caratterizzarne l'attività antilisterica.

### **Curva di crescita di *Lactobacillus plantarum* (*Listeria Dairy*, Danisco Holdbac)**

Per valutare la curva di crescita, la coltura liofilizzata di *L. plantarum* (*Listeria Dairy* Danisco Holdbac), inoculata in Lactobacilli de Man Rogosa Sharpe Broth (MRS broth, BD Difco™) seguendo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice (*Listeria Dairy*, Danisco Holdbac) in modo da avere una carica batterica di partenza intorno a  $10^2$  UFC/ml, è stata incubata a  $30^\circ\text{C}$  ed è stata valutata la carica batterica a diversi tempi di incubazione. Dopo 6 ore (T6) di incubazione la coltura presentava una carica di circa 3 log UFC/ml superiore rispetto a quella di partenza. Dopo 18 ore di incubazione *L. plantarum* era in grado di raggiungere una concentrazione di  $10^9$  UFC/ml (Figura 12).

Figura 12 – Curva di crescita *L. plantarum* in MRS broth a  $30^\circ\text{C}$



## **Determinazione dell'attività antimicrobica di *L. plantarum*: ruolo del mezzo di coltura e della temperatura di incubazione**

Per valutare in che modo la coltura liofilizzata commerciale di *Lactobacillus plantarum* (*Listeria Dairy*, Danisco Holdbac) fosse in grado di esercitare la sua attività antilisterica e per valutare se questa fosse influenzata dal mezzo di coltura nel quale il lattobacillo veniva fatto crescere, sono stati allestiti una serie di esperimenti allo scopo di caratterizzarne l'attività antilisterica.

Come ceppi indicatori nei saggi di attività antilisterica sono stati utilizzati tre diversi ceppi di *Listeria monocytogenes* (provenienti dalla collezione del Dipartimento di IAOA), appartenenti a tre diversi sierotipi (1/2b, 1/2c, 4b), più un ceppo di riferimento appartenente al sierotipo 1/2 b.

A tale scopo, la coltura di *L. plantarum* è stata risospesa in diversi mezzi di coltura: soluzione fisiologica (NaCl 0,85%), Trypton Soy Broth (TSB BD Difco™) Lactobacilli de Man Rogosa Sharpe Broth (MRS broth, BD Difco™) fino ad ottenere una concentrazione batterica iniziale di circa  $10^6$  UFC/ml.

Quando la coltura liofilizzata di *L. plantarum* è stata risospesa in soluzione fisiologica, è stata utilizzata immediatamente nei saggi di valutazione dell'attività antilisterica, mentre quando sono stati utilizzati come mezzi di crescita il TSB e il MRS broth, la coltura di *L. plantarum*, dopo l'inoculo nei rispettivi brodi di coltura è stata incubata a 30°C per 18 ore prima del suo uso sperimentale (temperatura e tempo di incubazione che consentono il raggiungimento di una carica batterica pari a  $10^9$  UFC/ml).

Le colture così ottenute di *L. plantarum* sono state quindi utilizzate negli esperimenti di Agar Well Diffusion Assay (AWDA) nei quali sono stati utilizzati come indicatori ceppi di *L. monocytogenes* appartenenti a differenti sierotipi (1/2b, 1/2c, 4b), più un ceppo di riferimento appartenente al sierotipo 1/2 b.

I risultati hanno mostrato che il mezzo nel quale il *L. plantarum* veniva inoculato giocava un ruolo importante nell'esplicare l'attività antilisterica. Infatti, si nota come non sia presente alcun alone di inibizione attorno ai pozzetti nei quali è presente la coltura di *L. plantarum* inoculata in soluzione fisiologica (NaCl 0,85%) (Figura 8, pozzetti: 1, 1C, 1K-), così come non è presente alcuna attività antilisterica nei pozzetti corrispondenti ai controlli negativi (contenenti 100µl dei rispettivi mezzi di coltura utilizzati) (Figura 8, pozzetti: 2K- e 3K-). Al contrario è ben

visibile un alone di inibizione attorno ai pozzetti contenenti il *L. plantarum* incubato in MRS broth e TSB (Figura 8, pozzetti rispettivamente 2 e 3).

### **Caratterizzazione dell'attività antilisterica del surnatante di colture di *L. plantarum***

Per valutare la modalità con la quale la coltura liofilizzata di *L. plantarum* fosse in grado di inibire la crescita dei differenti ceppi di *L. monocytogenes*, dalle colture over night di *L. plantarum* è stato ottenuto un surnatante privo di cellule (CFS, Cell Free Supernatant) che è stato successivamente testato in saggi di diffusione su piastra (AWDA).

Il surnatante privo di cellule (CFS) ottenuto dalla centrifugazione e filtrazione delle over night di *L. plantarum* incubate a 30°C in TSB e MRS broth, è stato utilizzato nei test di AWDA a contatto con i ceppi indicatori di *L. monocytogenes*: Lm 1102, Lm 1113, Lm 1142 e NCTC 10887. I risultati mostrano come l'alone d'inibizione sia maggiore attorno ai pozzetti contenenti il CFS, ottenuto sia dalle colture in MRS broth sia in TSB (Figura 8, pozzetti 2C e 3C) rispetto ai controlli (Figura 13, pozzetti 2K- e 3K-). Tale alone di inibizione è inoltre di dimensioni maggiori anche rispetto a quello ottenuto dal contatto delle colture di *L. plantarum*, utilizzate tali e quali con i ceppi di *L. monocytogenes* indicatori (Figura 13, pozzetti 2 e 3).

Figura 13 Risultati AWDA. Legenda 1: *L.plantarum* (Lpl) +NaCl; 1C: Lpl +NaCl centrifugato 10000g\*15' e filtrato con filtri 0,22  $\mu$ m ; 1K-: Na Cl. 2: Lpl + MRS; 2C: Lpl + MRS centrifugato 10000g\*15' e filtrato con filtri 0,22  $\mu$ m ; 2K-: MRS. 3: Lpl + TSB; 3C: Lpl + TSB centrifugato 10000g\*15' e filtrato con filtri 0,22  $\mu$ m ; 3K-: TSB.

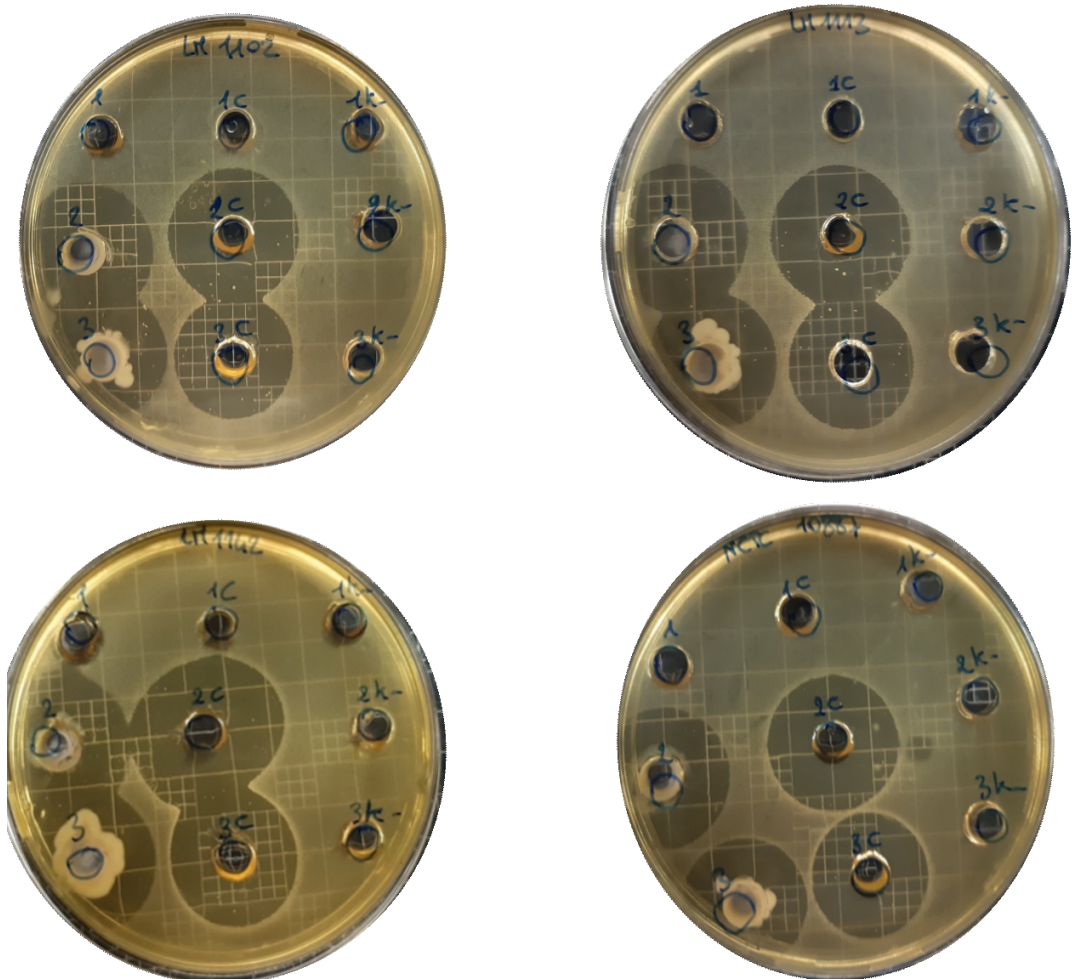




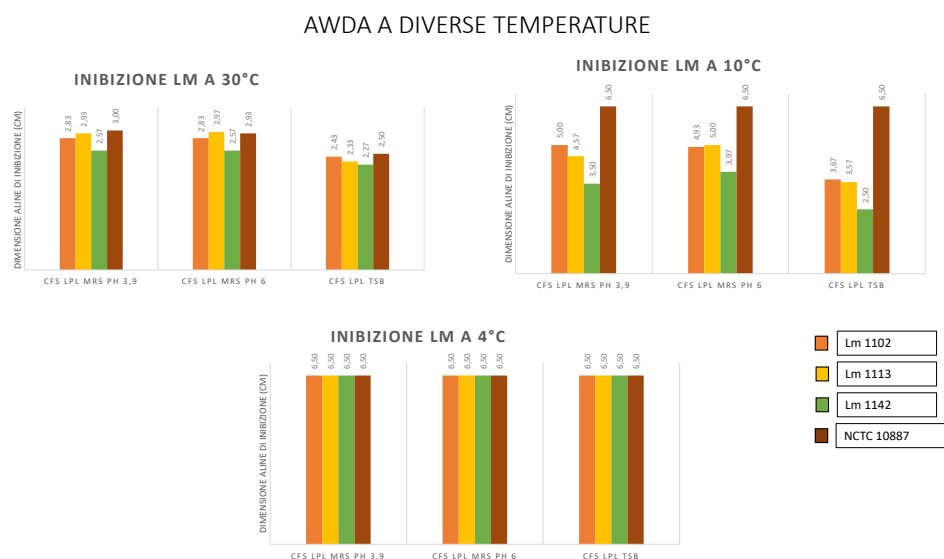
Tabella 7 Risultati AWDA, dimensioni espresse in cm dell'alone di inibizione presente attorno ai pozzetti.

CAMPIONI	1	1C	1 K-	2	2C	2K-	3	3C	3K-
Lm 1102	-	-	-	2,9	2,9	-	2,5	2,5	-
Lm 1102	-	-	-	3	3	-	2,5	2,5	-
Lm 1102	-	-	-	2,9	3	-	2,5	2,5	-
Lm 1113	-	-	-	2,7	2,9	-	2,5	2,5	-
Lm 1113	-	-	-	2,5	2,9	-	2,5	2,5	-
Lm 1113	-	-	-	2,8	2,7	-	2,5	2,5	-
Lm 1142	-	-	-	3	3	-	2,8	2,5	-
Lm 1142	-	-	-	3	3	-	2,4	2,7	-
Lm1142	-	-	-	2,8	3,1	-	2,3	2,5	-
NCTC 10887	-	-	-	2,5	2,5	-	2,4	2,3	-
NCTC 10887	-	-	-	2,6	2,5	-	2	2,3	-
NCTC 10887	-	-	-	2,8	2,7	-	2,4	2,3	-

Legenda 1: *L.plantarum* (Lpl) +NaCl; 1C: Lpl +NaCl centrifugato 10000g\*15' e filtrato con filtri 0,22 µm ; 1K-: Na Cl. 2: Lpl + MRS; 2C: Lpl + MRS centrifugato 10000g\*15' e filtrato con filtri 0,22 µm; 2K-: MRS. 3: Lpl + TSB; 3C: Lpl + TSB centrifugato 10000g\*15' e filtrato con filtri 0,22 µm; 3K-: TSB.

Il surnatante privato di cellule (CFS), ottenuto dalle colture di *L. plantarum* in MRS broth e TSB, è stato successivamente utilizzato nei test di AWDA dove è stato messo a contatto con i differenti ceppi di *L. monocytogenes* selezionati come indicatori: Lm 1102, Lm 1113, Lm 1142 e NTCC 10887 e incubato alle seguenti temperature: 30°C, 10° C e 4°C (rispettivamente la temperatura ottimale di crescita del patogeno, temperatura di un non corretto mantenimento della catena del freddo e la temperatura di conservazione del formaggio).

Figura 14 Risultati AWDA eseguiti a diverse temperature di incubazione: 30°C, 10°C e 4°C



Le piastre del AWDA sono state incubate per tempi diversi alle tre temperature in modo tale da creare le condizioni per l'ottimale sviluppo dei ceppi indicatori e per consentire la misurazione dell'alone di inibizione, dove presente. Le piastre incubate a 30°C sono state osservate dopo 24 ore. Il CFS ottenuto dalla coltura del *L. plantarum* in MRS broth e TSB mostra un'attività antilisterica paragonabile per tutti e quattro i ceppi di *L. monocytogenes* con un alone di inibizione che ha dimensioni inferiori o uguali ai 3 cm di diametro (Tabella 8). Quando gli stessi ceppi di *L. monocytogenes* venivano messi a contatto con il surnatante di *L. plantarum* e incubati ad una temperatura inferiore, 10°C e 4°C, si nota come l'attività inibitoria esercitata dal surnatante sia maggiore e questo è evidente dalle dimensioni maggiori dell'alone di inibizione di crescita della *Listeria* attorno ai pozzetti (Tabella 9 e 10).

Tabella 8 Risultati AWDA con incubazione delle piastre a 30°C per 24 ore

<b>30°C 24 h</b>				
<b>Ceppo Lm<sup>1</sup></b>	<b>CFS LPL<sup>2</sup> MRS pH 3,9</b>	<b>CFS LPL MRS pH 6</b>	<b>CFS LPL TSB<sup>3</sup></b>	<b>CN<sup>4</sup></b>
Lm 1102	2,83 *	2,83	2,43	0
Lm 1113	2,93	2,97	2,33	0
Lm 1142	2,57	2,57	2,27	0
NCTC 10887	3,00	2,93	2,50	0

Legenda: <sup>1</sup> Lm: *L. monocytogenes*; <sup>2</sup> CFS LPL: Surnatante privo di cellule di *L. plantarum* coltivato in MRS broth; CFS LPL: Surnatante privo di cellule di *L. plantarum* coltivato in TSB; <sup>4</sup> CN: controllo negativo (MRS broth/TSB); \* cm.

Tabella 9 Risultati AWDA con incubazione delle piastre a 10°C per 144 ore (6 giorni)

10°C 144 h				
Ceppo Lm <sup>1</sup>	CFS LPL MRS <sup>2</sup> pH 3,9	CFS LPL MRS pH 6	CFS LPL TSB <sup>3</sup>	CN <sup>4</sup>
Lm 1102	5,00 *	4,93	3,67	0
Lm 1113	4,57	5,00	3,57	0
Lm 1142	3,50	3,97	2,50	0
NCTC 10887	6,50	6,50	6,50	0

Legenda: <sup>1</sup> Lm: *L. monocytogenes*; <sup>2</sup> CFS LPL: Surnatante privo di cellule di *L. plantarum* coltivato in MRS broth; CFS LPL: Surnatante privo di cellule di *L. plantarum* coltivato in TSB; <sup>4</sup> CN: controllo negativo (MRS broth/TSB); \* cm.

Tabella 10 Risultati AWDA con incubazione delle piastre a 4°C per 264 ore (11 giorni)

4°C 264 h				
Ceppo Lm <sup>1</sup>	CFS LPL MRS <sup>2</sup> pH 3,9	CFS LPL MRS pH 6	CFS LPL TSB <sup>3</sup>	CN <sup>4</sup>
Lm 1102	6,50 *	6,50	6,50	0
Lm 1113	6,50	6,50	6,50	0
Lm 1142	6,50	6,50	6,50	0
NCTC 10887	6,50	6,50	6,50	0

Legenda: <sup>1</sup> Lm: *L. monocytogenes*; <sup>2</sup> CFS LPL: Surnatante privo di cellule di *L. plantarum* coltivato in MRS broth; CFS LPL: Surnatante privo di cellule di *L. plantarum* coltivato in TSB; <sup>4</sup> CN: controllo negativo (MRS broth/TSB); \* cm.

### **Inibizione dell'attività del surnatante ottenuto da colture di *L. plantarum* in seguito al trattamento con proteasi**

Per capire se l'attività antimicrobica esercitata dal surnatante fosse determinata dalla presenza di un composto proteico rilasciato dal *L. plantarum*, il CFS è stato trattato con enzimi proteolitici in grado di neutralizzare e inibire l'attività antilisterica. Pertanto, il CFS, ottenuto da colture over night a 30°C di *L. plantarum*, è stato trattato separatamente con: proteinasi K (33 U mg<sup>-1</sup>) e tripsina (105 U mg<sup>-1</sup>) (Sigma- Aldrich Corporation, USA) e successivamente testato in saggi di Agar Well Diffusion Assay (AWDA) utilizzando come ceppi indicatori dell'attività antilisterica i ceppi selezionati per gli esperimenti precedenti: Lm 1102, Lm 1113, Lm 1142 e NCTC 10887. Le piastre incubate a diverse temperature, 30°C, 10°C e 4°C, mostrano che in corrispondenza dei pozzetti nei quali è stato aggiunto il surnatante trattato con le proteasi non è presente alcun alone di inibizione a

dimostrazione del fatto che l'attività della molecola prodotta da *L. plantarum* è stata neutralizzata dall'azione delle proteasi, lasciando intendere che la sostanza con attività antilisterica possa essere di natura proteica.

### **Analisi di spettrometria di massa per l'identificazione del composto con attività antilisterica prodotto da *L. plantarum***

Per avere un'indicazione sul composto o sui composti responsabili dell'attività antilisterica esercitata da *L. plantarum*, la coltura è stata utilizzata, sotto la supervisione della Dott.ssa Paula O'Connor, presso i laboratori della Teagasc, per la purificazione e successiva analisi mediante HPLC.

La coltura di *L. plantarum*, in fase stazionaria di crescita è stata centrifugata e il pellet cellulare è stato separato dal surnatante.

### **Analisi dell'estratto cellulare di *L. plantarum*: purificazione**

L'estratto cellulare purificato è stato testato su piastra utilizzando come indicatore un ceppo di *L. monocytogenes*. I risultati ottenuti mostrano che l'attività inibitoria è stata trattenuta dalla colonna in quanto non vi è alcuna attività nel flusso attraverso la colonna (Figura 15, FT flow through) e non si riscontra alcuna attività nel lavaggio con etanolo al 30% (Figura 15, 30E) mentre è presente una marcata attività nell'eluato con l'eluente IPA (Figura 15, 70I2).

*Figure 15 Risultati AWDA delle frazioni di purificazione ottenute dall'estratto cellulare di *L. plantarum**

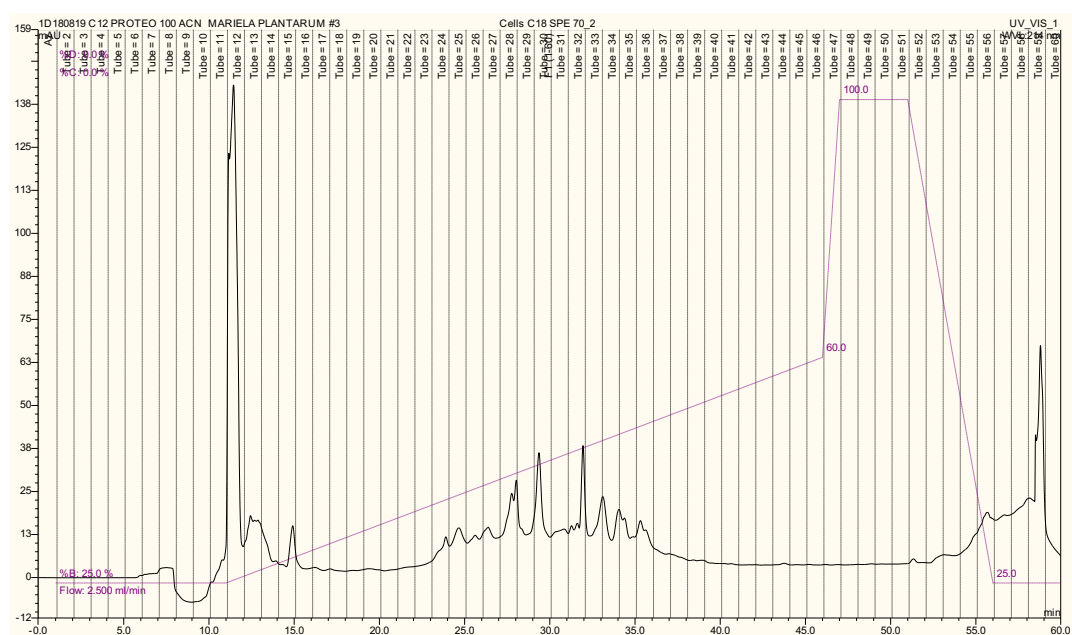


## Analisi HPLC dell'estratto cellulare purificato

L'IPA è stato rimosso dall'eluato ottenuto dalla purificazione in colonna Strata® C18-E SPE (Phenomenex, Cheshire, UK) e analizzato mediante HPLC (Phenomenex, Cheshire, UK). L'eluente è stato monitorato a 214 nm e le frazioni sono state raccolte a intervalli di 1 minuto.

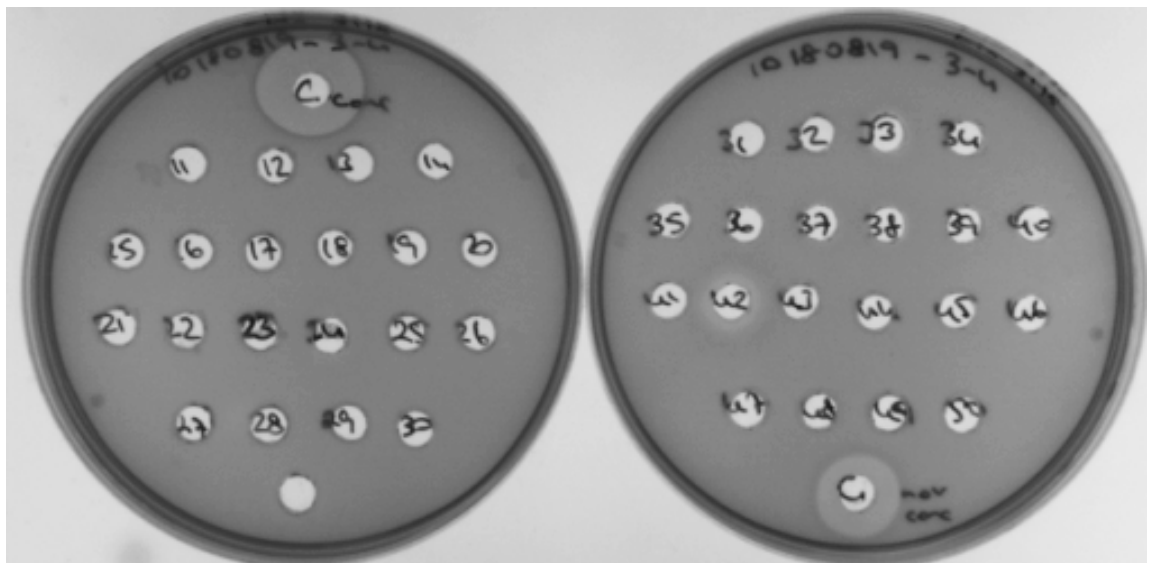
Dal cromatogramma (Figura 16) è possibile notare che la risposta mV ottenuta è molto bassa e questo è indice del fatto che il contenuto peptidico del campione è molto basso.

Figure 16 Cromatogramma dell'analisi di spettrometria di massa dell'estratto cellulare di *L. plantarum*.



Le frazioni raccolte a intervalli di 1 minuto e analizzate su piastre, utilizzando come indicatore *L. monocytogenes*, mostrano come l'estratto cellulare fosse attivo prima della concentrazione (Figura 17, in basso a destra – indicato con *C non conc*) ma l'attività sia stata persa poi durante la purificazione (Figura 17, in basso a sinistra – pozzetto senza indicazione). La perdita dell'attività inibitoria in questa fase potrebbe indicare che l'antimicrobico presente non sia associato alle cellule ma venga probabilmente secreto nel surnatante dalla coltura batterica.

Figura 17 Risultati AWDA dei composti ottenuti dalla purificazione dell'estratto cellulare di *L. plantarum*, frazioni raccolte a intervalli di 1 minuto (pozzetti 11-50); C conc.: estratto cellulare dopo concentrazione; C non conc: estratto cellulare prima della concentrazione.



#### Analisi del surnatante di *L. plantarum*: purificazione

Il surnatante ottenuto dalla coltura di *L. plantarum* è stato purificato mediante l'utilizzo di una colonna Econo contenente biglie di Amberlite® XAD16N (Phenomenex, Cheshire, Regno Unito) e successivamente testato su piastra utilizzando come ceppo indicatore *L. monocytogenes*. La piastra mostra che parte dell'attività inibitoria del surnatante è stata persa nel flusso attraverso la colonna (Figura 13, FT, flow through); inoltre, non si evidenzia alcuna attività inibitoria nel lavaggio con etanolo al 30% (Figura 18, 30E) mentre è chiara l'attività antimicrobica esercitata dal composto eluito nell'eluente IPA (Figura 18, 7012).

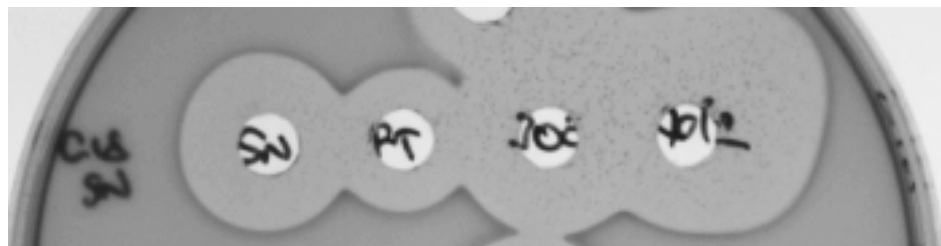
Figura 18 Risultati AWDA delle frazioni di purificazione ottenute dal surnatante di *L. plantarum*., ottenute dall'utilizzo di colonna Econo contenente biglie di Amberlite® XAD16N (Phenomenex, Cheshire, Regno Unito). SN: surnatante, FT: flow through, 30E: lavaggio con etanolo al 30%, 7012: composto eluito nell'eluente IPA.



L'IPA è stato successivamente rimosso dall'eluato e il campione è stato ulteriormente purificato mediante una colonna Strata® C18-E SPE (Phenomenex, Cheshire, UK). L'attività inibitoria dei prodotti derivanti dalla purificazione, il flusso attraverso la colonna (FT), la soluzione di lavaggio con etanolo al 30% e il composto eluito in IPA, è stata testata su piastra utilizzando come ceppo indicatore *L. monocytogenes*.

La piastra col ceppo di *L. monocytogenes* utilizzato come indicatore mostra come l'attività inibitoria venga in parte persa nel flusso attraverso la Colonna (FT) e nella soluzione di lavaggio con etanolo al 30%, ma gran parte dell'attività antimicrobica sia espressa nel composto eluito in IPA (Figura 19).

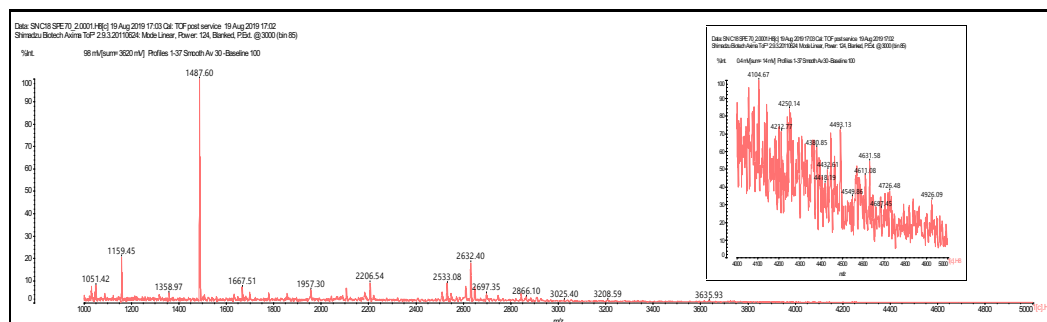
Figura 19 Risultati AWDA delle frazioni di purificazione ottenute dal surnatante di *L. plantarum*., ottenute dall'utilizzo di colonna Strata® C18-E SPE (Phenomenex, Cheshire, UK). SN: surnatante, FT: flow through, 30E: lavaggio con etanolo al 30%, 7012: composto eluito nell'eluente IPA.



### Analisi HPLC del surnatante

Il surnatante di *L. plantarum* purificato è stato analizzato mediante spettrometria di massa. L'eluato ottenuto mediante purificazione con colonna Strata® C18-E SPE (Phenomenex, Cheshire, UK) mostra un certo numero di potenziali masse antimicrobiche (Figura 20).

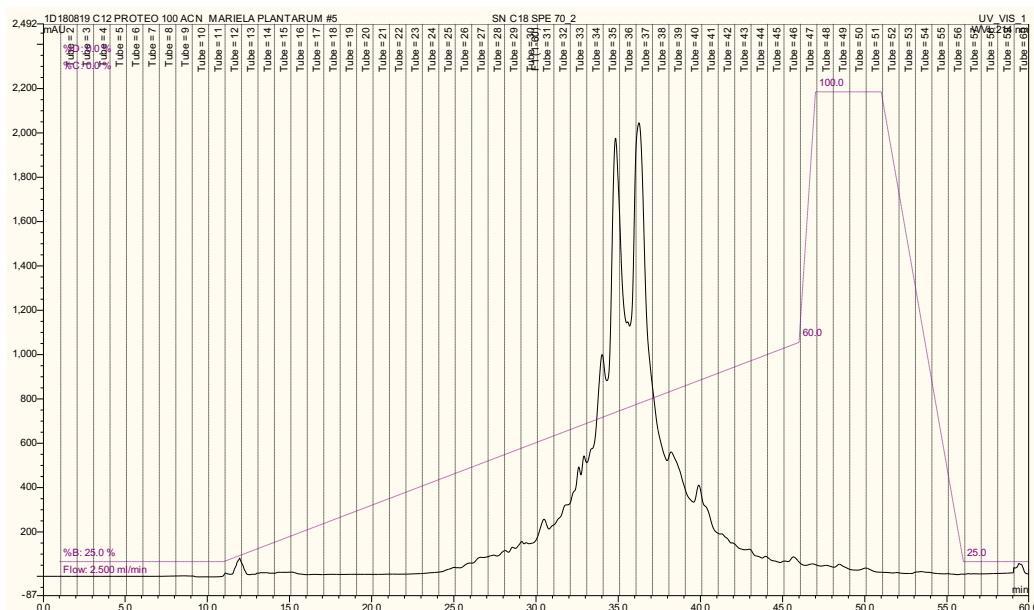
Figura 20 Spettro di massa ottenuto dall'analisi del surnatante purificato di *L. plantarum*.



Lo spettro di massa mostra una risposta mV molto più elevata per il campione di surnatante suggerendo che il contenuto di peptidi sia molto maggiore rispetto al

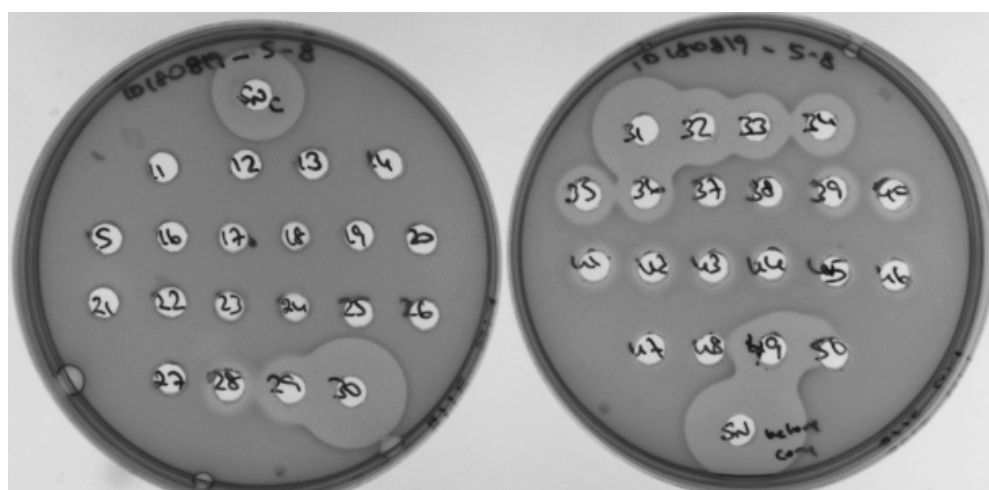
campione ottenuto dall'estratto cellulare. Si nota inoltre che la maggior parte dei picchi sono eluiti tra 30 e 40 minuti (Figura 21).

Figure 21 Cromatogramma dell'analisi di spettrometria di massa del surnatante di *L. plantarum*.



Le frazioni sono state raccolte a intervalli di 1 minuto ed è stata testata su piastra l'attività inibitoria di ciascuna, utilizzando come ceppo indicatore *L. monocytogenes*.

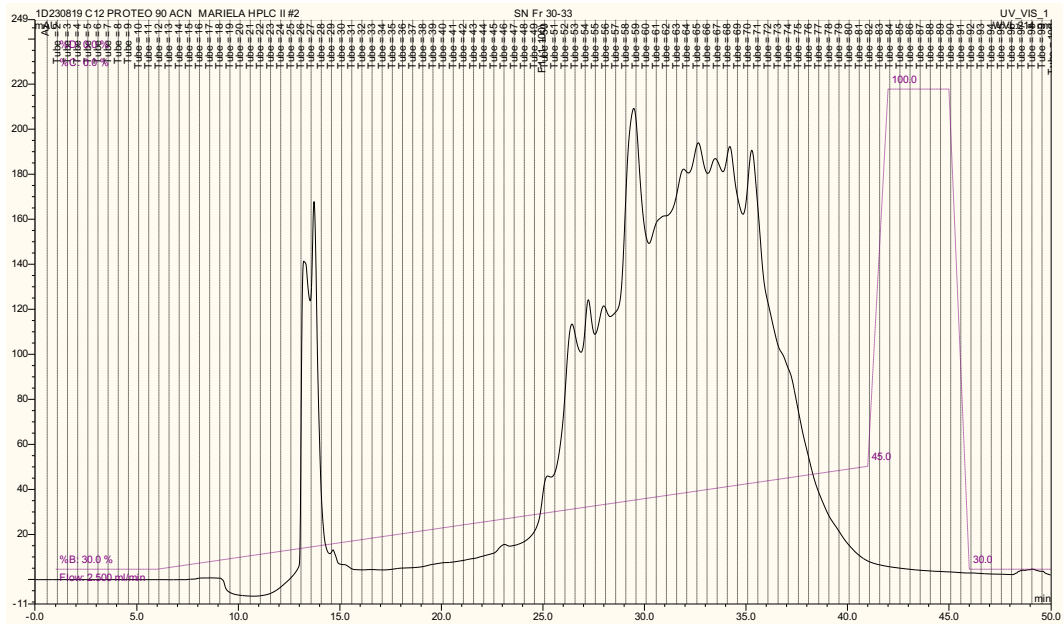
Figura 22 Risultati AWDA dei composti ottenuti dalla purificazione del surnatante di *L. plantarum*, frazioni raccolte a intervalli di 1 minuto (pozzetti 11-50); SNc: surnatante concentrato; SN non conc: surnatante non concentrato.



Le frazioni che presentavano una maggiore attività antilisterica (Figura 22, pozzetti 30-33) sono state raggruppate e concentrate per essere nuovamente analizzate sulla colonna HPLC. Il cromatogramma mostra come la maggior parte dei picchi sono eluiti tra 25 e 40 minuti (Figura 23).



Figure 23 Cromatogramma dell'analisi di spettrometria di massa delle frazioni 30-33 del surnatante di *L. plantarum*



Le frazioni raccolte a intervalli di 30 secondi, che seminate su piastra presentavano una maggiore attività antilisterica erano quelle dalla 61 alla 63 (Figura 24) e l'analisi dei rispettivi spettri mostra una massa dominante di 4624 Da che è simile alla massa della Pediocina (Figura 25).

Figura 24 Risultati AWDA dei composti ottenuti dalla purificazione del surnatante di *L. plantarum*, frazioni raccolte a intervalli di 30 secondi (pozzetti 43-82); SNC: surnatante concentrato; SN non conc: surnatante non concentrato.

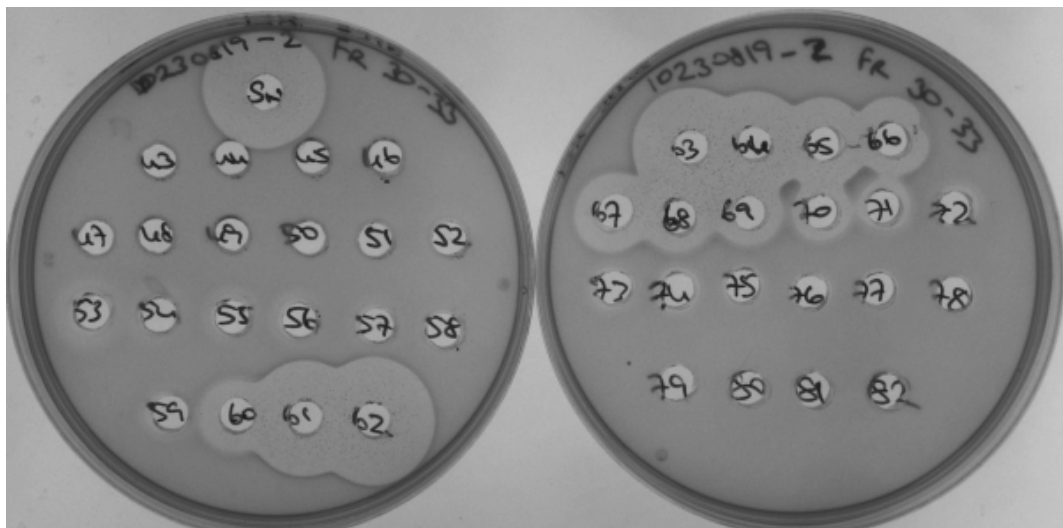
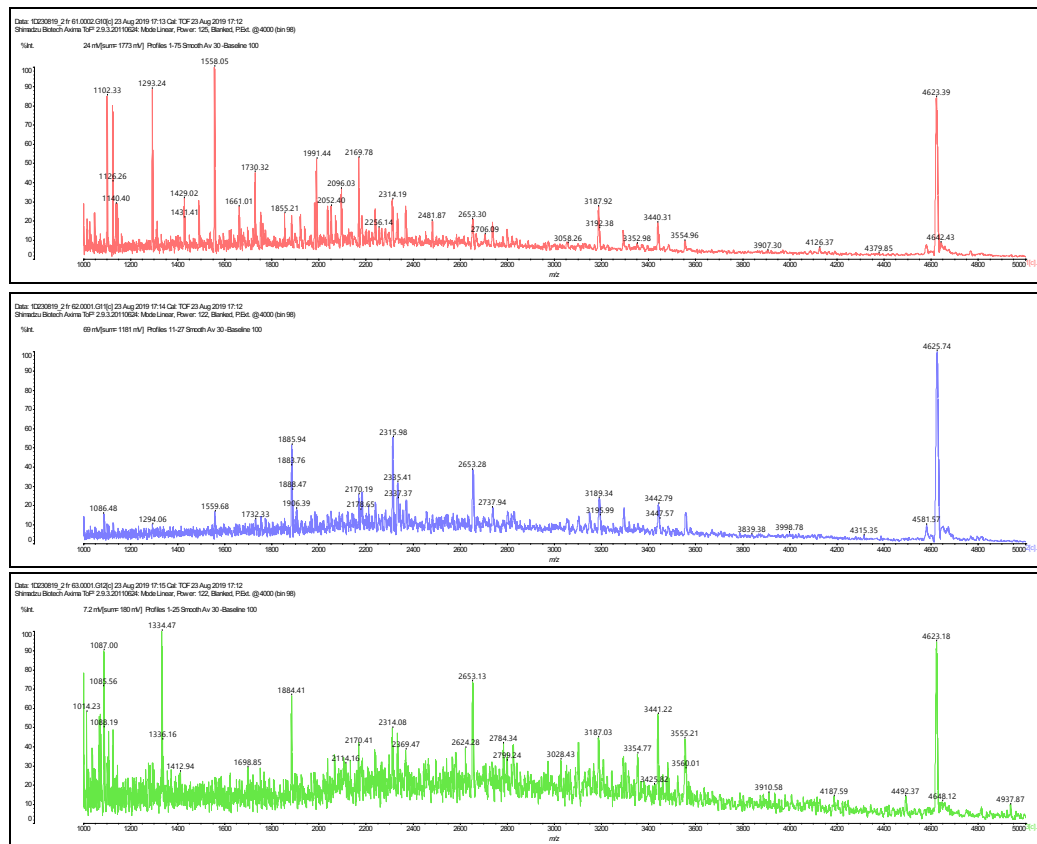


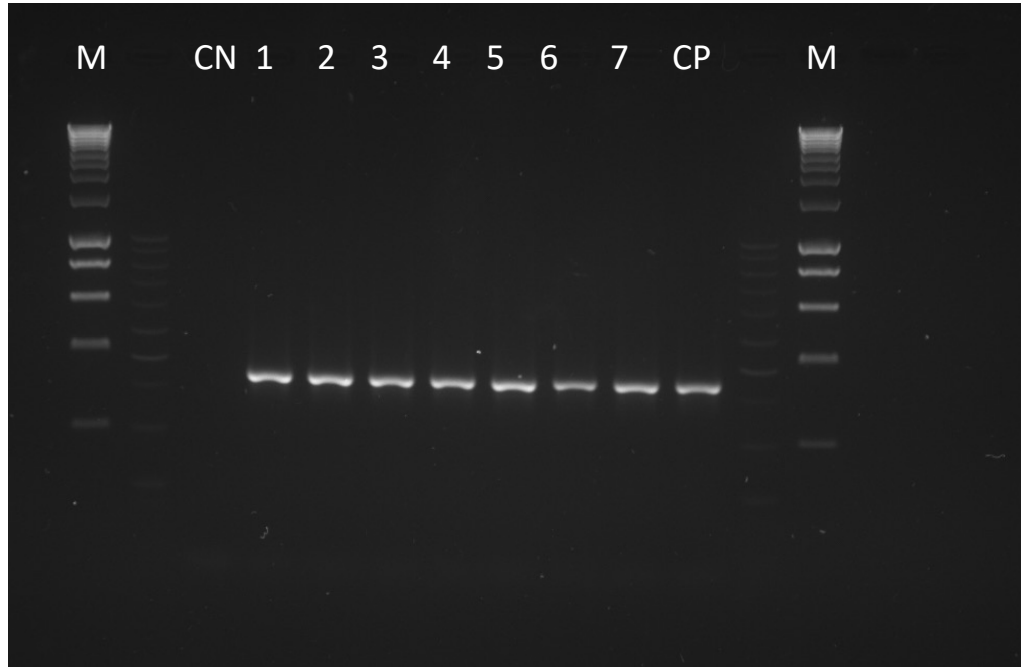
Figura 25 Spettri di massa ottenuti rispettivamente dall'analisi delle frazioni 61, 62 e 63 dalla purificazione del surnatante di *L. plantarum*



## Analisi molecolare del genoma di *L. plantarum* per la ricerca dei geni correlati alla pediocina

Per consolidare la teoria emersa dall'analisi del surnatante prodotto da *L. plantarum*, secondo cui la coltura sarebbe in grado di produrre e liberare una sostanza di natura proteica con attività antilisterica, correlata alla batteriocina Pediocina, è stata condotta un'indagine molecolare sugli isolati ottenuti dalla coltura liofilizzata di *L. plantarum* allo scopo di individuare, se presenti, i geni responsabili della produzione di tale molecola. Come controllo positivo è stato utilizzato il DNA estratto da colture di un ceppo di *Pediococcus spp.* produttore di pediocina (APC 3876 IMG 27351 fornito dalla collezione cellulare interna del laboratorio di Colture Cellulari Teagasc). L'analisi molecolare ha portato all'amplificazione di un segmento del genoma di *L. plantarum* delle dimensioni di circa 332bp esattamente come il *locus* dei geni codificanti per la Pediocina presenti nel ceppo di *Pediococcus spp.* produttore di pediocina, utilizzato come controllo positivo (Figura 26).

Figura 26 Risultati indagine molecolare dei ceppi di *L.plantarum*. M: marker 1Kb; CN: controllo negativo; 1-7: campioni di DNA estratto dalle colonie di *L. plantarum*; CP: controllo positivo, DNA estratto da *Pediococcus spp* produttore di pediocina.



### **Caratterizzazione in vivo dell'attività antilisterica di *L. plantarum***

Dopo aver acquisito le informazioni preliminari riguardo il meccanismo con il quale *L. plantarum* esercita la propria attività antilisterica, si è valutato in che modo tale coltura potesse essere utilizzata in vivo per inibire la contaminazione da *L. monocytogenes* del formaggio fresco ovino Primo Sale.

Attraverso delle prove di laboratorio, è stata valutata la crescita di *L. plantarum* in diverse matrici (latte ovino, siero di latte ovino e scotta), al fine di individuare la matrice ideale per la creazione di una coltura madre, da utilizzare nella produzione del formaggio. L'obiettivo delle prove sperimentali era quello di stabilire le caratteristiche di crescita di *L. plantarum* in diverse matrici (latte ovino, siero di latte ovino e scotta) e definire a quale concentrazione fosse in grado di produrre una quantità di batteriocina tale da inibire la crescita di *L. monocytogenes*, tenendo conto anche di temperatura e pH della matrice di crescita. Infine, in stretta collaborazione con l'azienda si è cercato di stabilire in quale fase del processo produttivo del formaggio fosse necessario aggiungere la coltura protettiva e in quale concentrazione, per ottenere la maggior inibizione dello sviluppo di *L.*

*monocytogenes*. I risultati ottenuti dalle prove sperimentali in vitro hanno dimostrato come la coltura protettiva di *L. plantarum* presenti gli incrementi di crescita maggiori se inoculata sulla scotta, raggiungendo concentrazioni di  $10^8$  UFC/ml dopo 12 ore di incubazione a 37°C (Figura 29), mentre nelle altre matrici (latte e siero di latte) non si registravano concentrazioni maggiori di  $10^7$  UFC/ml anche in seguito ad incubazione per 10 e 12 ore rispettivamente (Figure 27 e 28).

Figura 27 Curva di crescita di *L. plantarum* (LPL) in latte ovino a 37°C

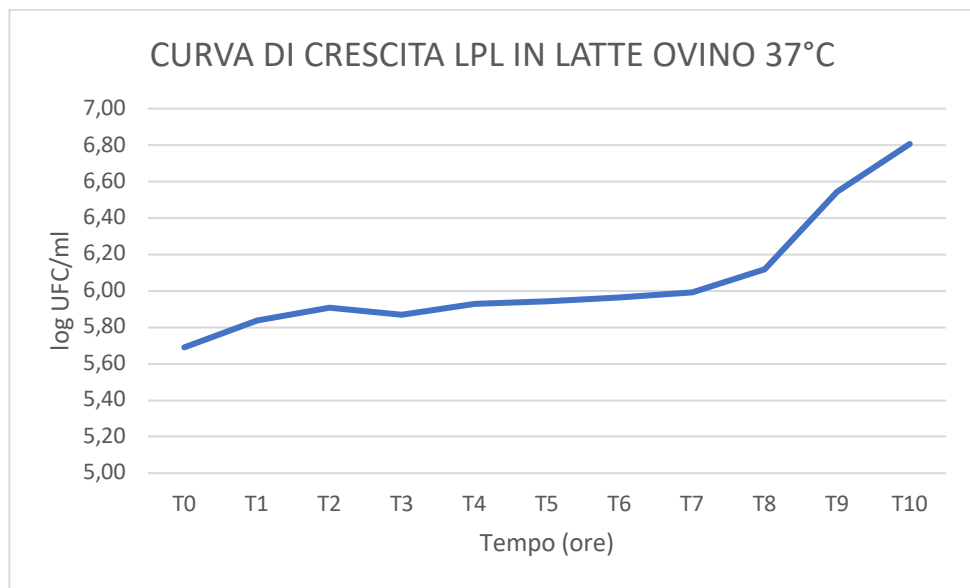


Figura 28 Curva di crescita di *L. plantarum* (LPL) in siero di latte ovino a 37°C

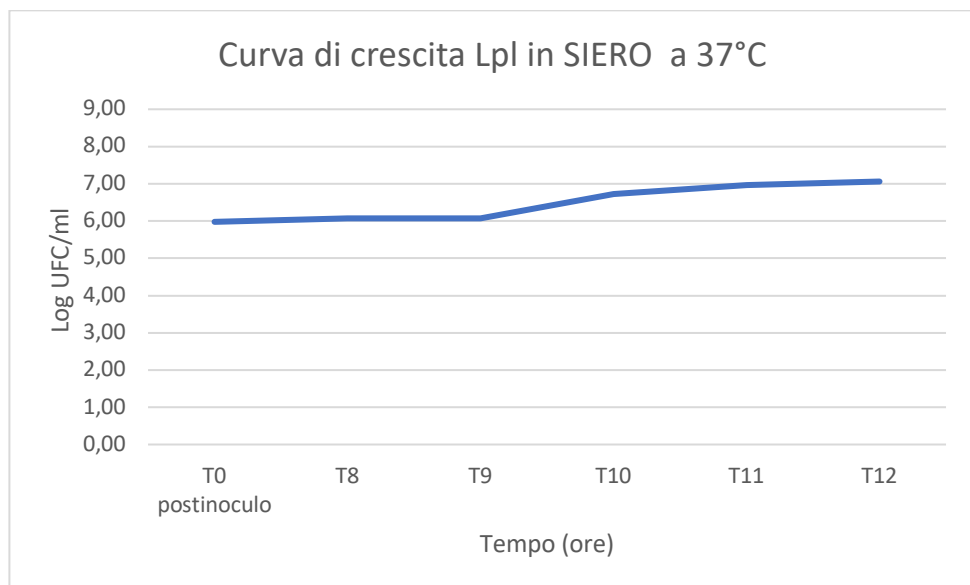
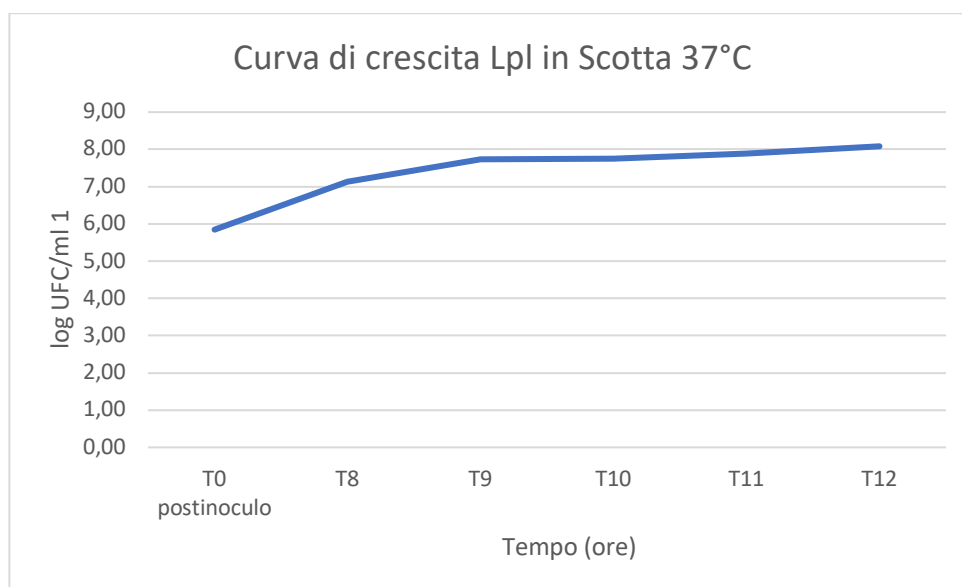


Figura 29 Curva di crescita di *L. plantarum* (LPL) in scotta a 37°C



Inoltre, si è proceduto alla valutazione della curva di acidificazione (pH) delle varie matrici utilizzate, dopo l'inoculo di *L. plantarum* e alla temperatura di 37°C, questa analisi ha evidenziato come nel latte ovino inoculato, si raggiungessero valori pari a 5,67 (media dei valori ottenuti su 3 campioni) dopo 10 ore di incubazione (Figura 30), nel siero di latte ovino, dopo 12 ore di incubazione, il pH ha raggiunto un valore medio di 4,72 (media dei dati relativi ai 3 campioni analizzati), sempre dopo incubazione a 37°C (Figura 31), mentre nella scotta, dopo 12 ore di incubazione, nei tre campioni analizzati, il pH ha raggiunto un valore medio di 4,69 (Figura 32).

Figura 30 Curva di acidificazione (pH) del latte ovino in seguito all'inoculo di *L. plantarum* a 37°C

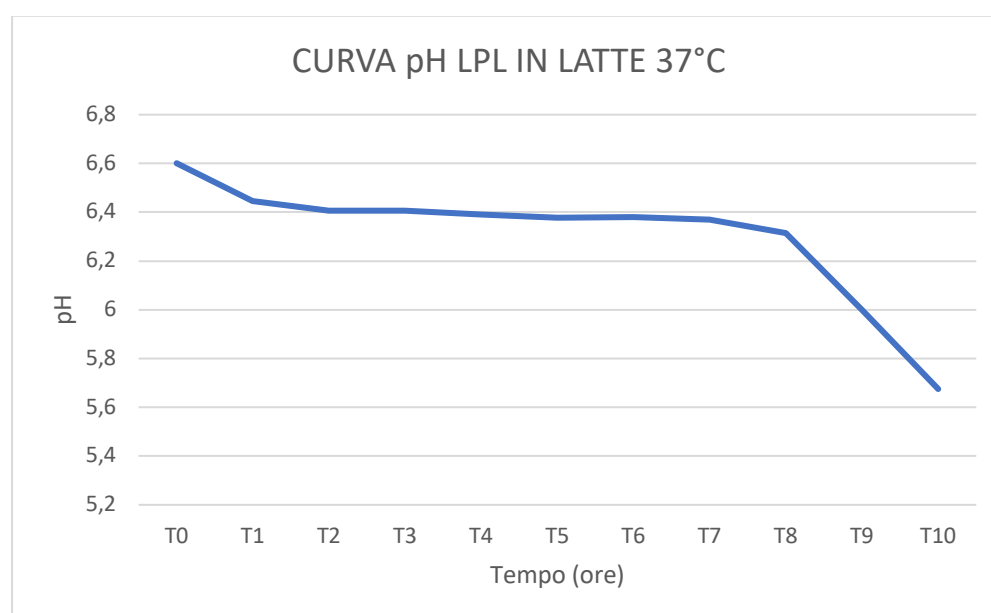


Figura 31 Curva di acidificazione (pH) del siero di latte ovino in seguito all'inoculo di *L. plantarum* a 37°C

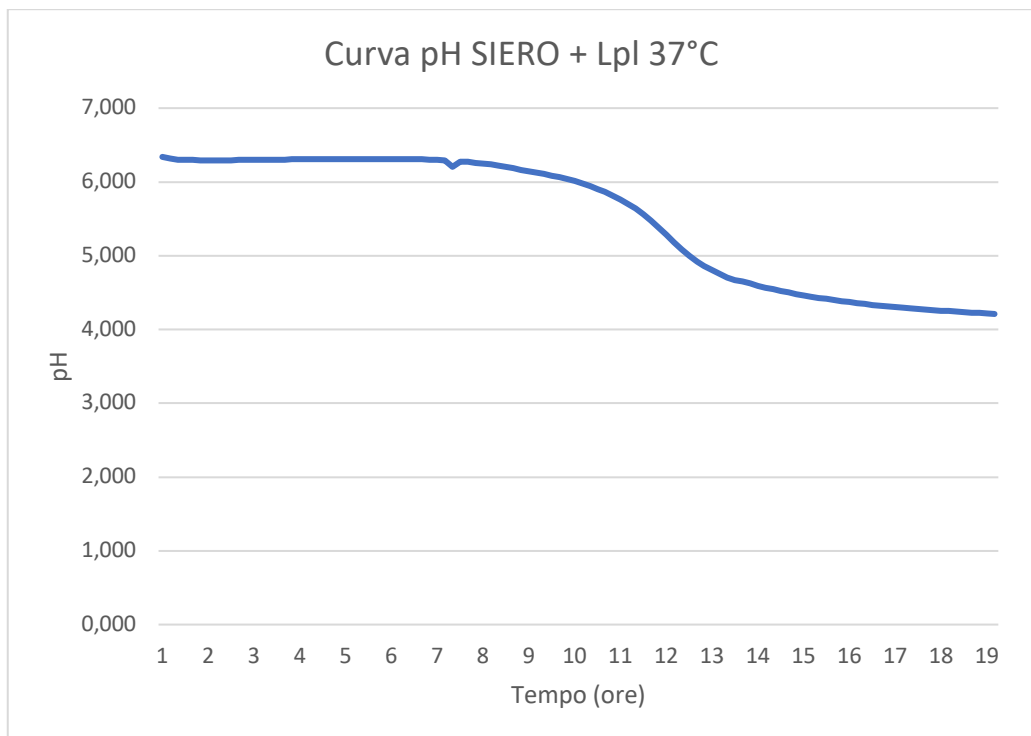
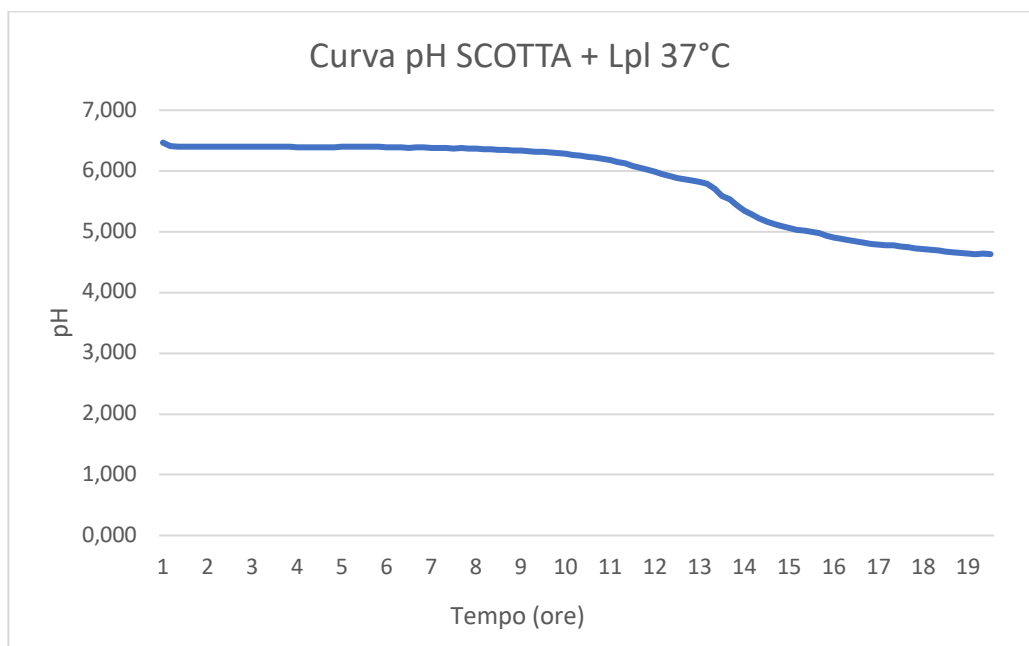


Figura 32 Curva di acidificazione (pH) della scotta in seguito all'inoculo di *L. plantarum* a 37°C



### **Preparazione della coltura madre di *L. plantarum* in scotta**

Dopo aver elaborato i dati ottenuti dalle prove di laboratorio eseguite su latte ovino, siero di latte ovino e scotta, si è deciso di utilizzare la scotta come matrice ideale

per la crescita di *L. plantarum*, da utilizzare in caseificio per creare una coltura madre da inserire nel latte al momento della lavorazione del formaggio Primo Sale.

### **Campionamento e analisi dei parametri chimici e microbiologici**

Durante ognuna delle tre giornate di lavorazione (una per ciascun lotto campionato) sono state predisposte due polivalenti per la lavorazione di due differenti preparazioni:

- una per il Primo Sale con l'aggiunta della scotta innesto contenente il *L. plantarum*;
- una per il Primo Sale senza la scotta innesto.

Per ognuna delle due preparazioni sono stati prelevati 300 g di cagliata subito dopo la rottura e un campione da 500 ml di scotta innesto prima dell'inoculo in polivalente, dai quali sono stati rilevati i seguenti parametri: pH e temperatura, i cui valori sono riportati in Tabella 11.

*Tabella 11 Valutazione del pH e della temperatura della scotta e della cagliata successivamente alla rottura del coagulo*

Tipologia di campioni*	I lotto		II lotto		III lotto	
	pH	T	pH	T	pH	T
scotta+LPL	5,5		5,60		4,25	2,7°C
cagliata PS+LPL	6,60	35°C	6,48	34°C	6,52	36,5°C
cagliata PS-LPL	6,56	36,3°C	6,50	37°C	6,52	37,4°C

\* LPL: coltura protettiva *L. plantarum*; PS: cagliata Primo Sale

I risultati mostrano come i valori di pH e temperatura siano pressoché costanti per i tre lotti, sia nella scotta innesto sia nei campioni derivanti dalle due tipologie di produzione. Gli stessi campioni sono stati inoltre trasportati, alla temperatura di 4°C, presso la facoltà di Medicina Veterinaria di Sassari, settore di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, dove sono stati trattati per allestire la semina in MRS, da incubare a 30°C in modo da valutare la crescita dei lattobacilli, compreso *L. plantarum*. I risultati sono elencati in Tabella 12.

Tabella 12 Determinazione di batteri lattici in campioni di scotta e di cagliata successivamente alla rottura del coagulo

Tipologia di campioni*	I lotto	II lotto	III lotto
	MRS 30°C	MRS 30°C	MRS 30°C
scotta+LPL	9,43 <sup>2</sup>	6,85	7,36
cagliata PS+LPL	4,46 <sup>3</sup>	5,91	6,45
cagliata PS-LPL	5,80	nr	6,48

\* LPL: coltura protettiva *L. plantarum*; PS: cagliata Primo Sale, <sup>2</sup>log UFC/ml; <sup>3</sup>log UFC/gr; nr: parametro non determinato.

Il giorno successivo a quello della lavorazione di ogni lotto di produzione del Primo Sale, sono stati prelevati, presso il caseificio, i campioni della cagliata prima del trasferimento in salamoia per tutte e due le preparazioni campionate il giorno precedente:

- 300g di cagliata di Primo Sale, preparato con l'aggiunta della scotta innesto;
- 300g di cagliata di Primo Sale, preparato senza l'aggiunta della scotta innesto.

In contemporanea sono stati rilevati, per ogni campione prelevato, il pH e la temperatura i cui dati sono riassunti in Tabella 13.

Tabella 13 Valutazione del pH e della temperatura della cagliata dopo 12 ore di acidificazione e subito prima dell'immersione in salamoia

Tipologia di campioni*	I lotto		II lotto		III lotto	
	pH	T	pH	T	pH	T
cagliata PS+LPL	5,30	18°C	5,20	20°C	5,20	18°C
cagliata PS-LPL	5,34	18°C	5,20	20°C	5,15	18°C

\* LPL: coltura protettiva *L. plantarum*; PS: cagliata Primo Sale

Gli stessi campioni seminati in MRS agar, incubati a 30°C per valutare la crescita dei lattobacilli, compreso *L. plantarum*, hanno prodotto le seguenti conte riportate in Tabella 14.



Tabella 14 Determinazione di batteri lattici in campioni di cagliata dopo 12 ore di acidificazione e subito prima della immersione in salamoia.

Tipologia di campioni*	I lotto	II lotto	III lotto
	MRS 30°C	MRS 30°C	MRS 30°C
cagliata PS+LPL	7,06	6,80	7,26
cagliata PS-LPL	7,16	nr	5,08

\*LPL: coltura protettiva *L. plantarum*; PS: cagliata Primo Sale, <sup>2</sup>log UFC/ml; <sup>3</sup>log UFC/gr; nr: parametro non determinato.

Dall'osservazione delle conte batteriche ottenute dai campioni prelevati in caseificio e inoculate nelle piastre di MRS incubate a 30°C, si può notare una crescita microbica molto variabile, sia per il formaggio preparato con l'aggiunta della scotta innesto, sia per quello preparato senza la scotta innesto. Chiaramente, i microrganismi cresciuti nelle piastre possono essere riconducibili sia al *L. plantarum* aggiunto con la scotta innesto, ma anche ai microrganismi presenti nel latte, nel caglio microbico utilizzato e negli impianti di lavorazione.

### Challenge test Primo Sale

Presso il caseificio, successivamente alla produzione dei campioni, per ciascuno dei tre lotti di lavorazione di primo Sale si è proceduto allo stoccaggio delle forme identificate:

- n.15 forme di Primo Sale, preparato con la scotta innesto (Ps + Lpl);
- n.15 forme di Primo Sale, preparato senza la scotta innesto (Ps).

Il piano di campionamento prevedeva che per ciascun lotto di produzione venissero campionate 6 forme come segue: per ciascun lotto di produzione 3 forme addizionate con la scotta innesto contenente la coltura protettiva e 3 forme senza l'innesto della coltura protettiva da utilizzare come campione di controllo per l'andamento della contaminazione da *L. monocytogenes*. Successivamente ogni forma veniva porzionata e gli spicchi che costituivano i controlli negativi venivano confezionati sottovuoto e trasferiti alle due temperature di stoccaggio: 4°C e 10°C. Le restanti porzioni venivano sottoposte al successivo inoculo sperimentale con un mix di ceppi di *L. monocytogenes* (gli stessi utilizzati nelle prove in vitro, appartenenti ai diversi sierotipi) per simulare una contaminazione post processo. I

campioni sottoposti a contaminazione sperimentale venivano poi stoccati a due differenti temperature, la prima a 4°C per simulare lo stoccaggio corretto e la seconda a 10°C per simulare un non corretto mantenimento della catena del freddo come potenzialmente ipotizzato nella conservazione domestica. Pertanto, le forme destinate al challenge test venivano divise in 8 spicchi:

- n.2 spicchi da analizzare a T0 (cioè il giorno successivo a quello della contaminazione con *Listeria monocytogenes* e al successivo confezionamento sottovuoto) uno da stoccare a 4°C e uno a 10°C;
- n.2 spicchi da analizzare a T1 (cioè dopo 20 giorni, corrispondenti alla shelf life del prodotto, dalla produzione e dalla contaminazione con *Listeria monocytogenes* e al confezionamento sottovuoto), uno da stoccare a 4°C e uno a 10°C;
- n.4 spicchi, utilizzati come controlli negativi, non sottoposti a contaminazione con *Listeria monocytogenes*, da analizzare a T0 e T1, due da stoccare a 4°C e due a 10°C.

I dati ottenuti (Tabella 15 -17) mostrano che per tutti e tre i lotti campionati è osservabile una lieve riduzione del livello di contaminazione sperimentale da *L. monocytogenes* riguardante solo i campioni addizionati alla coltura protettiva di *L. plantarum* presente nella scotta innesto (Ps +Lpl), mentre il valore subisce un incremento nei campioni prodotti senza l'aggiunta della coltura protettiva (Ps). Tale andamento è paragonabile per le due temperature di stoccaggio: 4°C e 10°C.

Al contrario, nell'analisi con la metodica qualitativa, nel primo e secondo lotto non sono apprezzabili variazioni del livello di contaminazione da *L. monocytogenes* tra i campioni addizionati della coltura protettiva (Ps +Lpl) e i campioni prodotti senza l'aggiunta della coltura protettiva (Ps). Tale variazione risulta essere, invece, più evidente nei campioni del terzo lotto nei quali la contaminazione da *L. monocytogenes* è sensibilmente diminuita nei campioni addizionati della coltura protettiva (Ps +Lpl) rispetto quelli prodotti senza l'aggiunta di *L. plantarum* (Ps), per entrambe le temperature di stoccaggio. Contemporaneamente si è evidenziato in entrambe le tipologie di campione un considerevole aumento del valore relativo alla presenza dei batteri lattici (MRS a 30°C).

Nei campioni rappresentanti i controlli negativi (PS controllo) non si evidenzia, per tutti e tre i lotti campionati, alcuna contaminazione da *L. monocytogenes* ai due tempi di incubazione e alle rispettive temperature di stoccaggio.

Tabella 15 Lotto 1 - determinazione parametri microbiologici su spicchi Primo Sale confezionati sottovuoto a differenti temperature e tempi di stoccaggio

Tipologia campione	lotto	Temperatura stoccaggio	Tempo stoccaggio in cella	MRS <sup>1</sup>	LM quantitativa <sup>1</sup>	LM qualitativa <sup>2</sup>
PS + Lpl	1	4°C	T0	6,83±0,92 (3/3)	1,57±0,47 (3/3)	+ (3/3)
PS	1	4°C	T0	7,03±0,28 (3/3)	0,53±0,92 (1/3)	+ (3/3)
PS controllo	1	4°C	T0	7,53±0,23 (3/3)	(0/3)	- (0/3)
PS + Lpl	1	10°C	T0	7,22±0,80 (3/3)	1,36±0,32 (3/3)	+ (3/3)
PS	1	10°C	T0	7,54±0,26 (3/3)	0,83±0,75 (2/3)	+ (3/3)
PS controllo	1	10°C	T0	7,53±0,23 (3/3)	(0/3)	- (0/3)
PS + Lpl	1	4°C	T1 – 20 giorni	8,41±0,55 (3/3)	1,36±0,10 (3/3)	+ (3/3)
PS	1	4°C	T1 – 20 giorni	8,58±0,45 (3/3)	1,07±0,92 (2/3)	+ (3/3)
PS controllo	1	4°C	T1 – 20 giorni	8,33±0,34 (3/3)	(0/3)	- (0/3)
PS + Lpl	1	10°C	T1 – 20 giorni	8,65±0,75 (3/3)	0,33±0,58 (1/3)	+ (2/3)
PS	1	10°C	T1 – 20 giorni	9,34±0,16 (3/3)	1,44±0,42 (3/3)	+ (3/3)
PS controllo	1	10°C	T1 – 20 giorni	8,64±0,24 (3/3)	(0/3)	- (0/3)

PS + Lpl: Primo Sale addizionato con coltura protettiva; PS: Primo Sale senza coltura protettiva; PS controllo: Primo Sale non contaminato con *L. monocytogenes*. <sup>1</sup> media±ds ufc/ml su numero campioni positivi; <sup>2</sup> presenza/assenza su numero campioni positivi.

Tabella 16 Lotto 2 - determinazione parametri microbiologici su spicchi di Primo Sale confezionati sottovuoto a differenti temperature e tempi di stoccaggio

Tipologia campione	lotto	Temperatura stoccaggio	Tempo stoccaggio in cella	MRS <sup>1</sup>	LM quantitativa <sup>1</sup>	LM qualitativa <sup>2</sup>
PS + Lpl	2	4°C	T0	8,16±0,13 (3/3)	1,26±0,24 (3/3)	+ (3/3)
PS	2	4°C	T0	6,54±0,28 (3/3)	1,20±0,17 (3/3)	+ (3/3)
PS controllo	2	4°C	T0	7,83±0,13 (3/3)	(0/3)	- (0/3)
PS + Lpl	2	10°C	T0	8,09±0,14 (3/3)	1,26±0,24 (3/3)	+ (3/3)
PS	2	10°C	T0	6,60±0,56 (3/3)	1,31±2,27 (3/3)	+ (3/3)
PS controllo	2	10°C	T0	7,76±0,09 (3/3)	(0/3)	- (0/3)
PS + Lpl	2	4°C	T1 – 20 giorni	7,94±0,10 (3/3)	0 (0/3)	+ (1/3)
PS	2	4°C	T1 – 20 giorni	8,61±0,11 (3/3)	1,27±0,24 (3/3)	+ (3/3)
PS controllo	2	4°C	T1 – 20 giorni	8,56±0,08 (3/3)	(0/3)	- (0/3)
PS + Lpl	2	10°C	T1 – 20 giorni	7,98±0,08 (3/3)	0 (0/3)	+ (1/3)
PS	2	10°C	T1 – 20 giorni	8,73±0,25 (3/3)	1,31±2,27 (3/3)	+ (3/3)
PS controllo	2	10°C	T1 – 20 giorni	8,94±0,11 (3/3)	(0/3)	- (0/3)

PS + Lpl: Primo Sale addizionato con coltura protettiva; PS: Primo Sale senza coltura protettiva; PS controllo: Primo Sale non contaminato con *L. monocytogenes*. <sup>1</sup> media±ds ufc/ml su numero campioni positivi; <sup>2</sup> presenza/assenza su numero campioni positivi.

Tabella 17 Lotto 3 - determinazione parametri microbiologici su spicchi di Primo Sale confezionati sottovuoto a differenti temperature e tempi di stoccaggio

Tipologia campione	lotto	Temperatura stoccaggio	Tempo stoccaggio in cella	MRS <sup>1</sup>	LM quantitativa <sup>1</sup>	LM qualitativa <sup>2</sup>
PS + Lpl	3	4°C	T0	7,08±0,09 (3/3)	1,71±0,24 (3/3)	+ (3/3)
PS	3	4°C	T0	6,12±0,22 (3/3)	0,62±1,07 (1/3)	+ (3/3)
PS controllo	3	4°C	T0	7,09±0,11 (3/3)	(0/3)	- (0/3)
PS + Lpl	3	10°C	T0	7,30±0,24 (3/3)	1,46±0,45 (3/3)	+ (3/3)
PS	3	10°C	T0	6,15±0,11 (3/3)	1,13±0,12 (2/3)	+ (3/3)
PS controllo	3	10°C	T0	7,46±0,19 (3/3)	(0/3)	- (0/3)
PS + Lpl	3	4°C	T1 – 20 giorni	7,89±0,25 (3/3)	0 (0/3)	- (0/3)
PS	3	4°C	T1 – 20 giorni	9,04±0,48 (3/3)	1,10±0,17 (3/3)	+ (3/3)
PS controllo	3	4°C	T1 – 20 giorni	8,66±0,10 (3/3)	(0/3)	- (0/3)
PS + Lpl	3	10°C	T1 – 20 giorni	7,71±0,16 (3/3)	0 (0/3)	- (0/3)
PS	3	10°C	T1 – 20 giorni	8,87±0,48 (3/3)	1,20±0,17 (3/3)	+ (2/3)
PS controllo	3	10°C	T1 – 20 giorni	8,84±0,21 (3/3)	(0/3)	- (0/3)

PS + Lpl: Primo Sale addizionato con coltura protettiva; PS: Primo Sale senza coltura protettiva; PS controllo: Primo Sale non contaminato con *L. monocytogenes*. <sup>1</sup> media±ds ufc/ml su numero campioni positivi; <sup>2</sup> presenza/assenza su numero campioni positivi.

## DISCUSSIONE

La presenza di *L. monocytogenes* negli alimenti determina notevoli implicazioni di ordine sanitario ed economico, suscitando l'interesse sia delle Autorità Sanitarie competenti, sia degli operatori del settore alimentare (OSA) e degli enti di ricerca in merito allo sviluppo di strategie di controllo delle contaminazioni di questo patogeno negli stabilimenti e quindi nei prodotti finiti. Inoltre, la sempre maggiore consapevolezza dei consumatori e la preoccupazione per l'utilizzo di conservanti chimici hanno portato i ricercatori a concentrarsi sull'identificazione di efficaci composti antimicrobici naturali che fossero in grado di aumentare la shelf-life degli alimenti senza modificarne lo stato nutrizionale o la sicurezza. A questo proposito, alcuni batteri lattici (LAB: lactic acid bacteria), grazie alla loro capacità di agire come antagonisti di numerosi batteri patogeni hanno mostrato un grande potenziale nella conservazione degli alimenti e sembra che siano in grado di ridurre o eliminare la necessità di aggiungere additivi chimici garantendo alimenti di alta qualità (Perez et al., 2014). Alcuni membri del gruppo LAB, tra i quali il *Lactobacillus plantarum*, esplicano la loro attività antimicrobica attraverso la secrezione di peptidi antibatterici noti come batteriocine (Nishie et al. 2012) capaci di inibire lo sviluppo di alcuni microrganismi patogeni tra i quali *L. monocytogenes* (Mills et al., 2011). Tale proprietà fa di questa specie un ottimo candidato per l'impiego in tecniche di biocontrollo nella conservazione di alimenti (Sorrentino et al., 2013). Nonostante la maggior parte delle batteriocine isolate prodotte da *L. plantarum* siano appartenenti al gruppo delle plantaricine (Messi et al., 2001), alcuni studi hanno mostrato la capacità di alcuni ceppi di produrre un altro tipo di batteriocina, chiamata pediocina, particolarmente attiva contro una vasta gamma di batteri patogeni, tra i quali *L. monocytogenes* (Xie et al. nel 2011). Partendo da questo presupposto diversi studi hanno cercato di chiarire quali fossero le condizioni di crescita ottimali del *L. plantarum* tali da consentire una produzione adeguata di batteriocine efficace a contrastare la crescita dei patogeni bersaglio (Delgado A, et al., 2007; Leal-Sánchez MV, et al., 2002; Todorov SD, et al. 2004). Tuttavia, nonostante i recenti progressi nella comprensione dei meccanismi alla base della produzione delle batteriocine il loro utilizzo, nell'industria alimentare in generale e lattiero-casearia in particolare, rimane limitato sia per l'elevato costo dell'isolamento e della purificazione, sia a causa della legislazione alimentare restrittiva delle autorità di regolamentazione sanitaria (FDA ed EFSA) che frena

l'approvazione di nuove batteriocine come conservanti alimentari (Reg. CE 1333/2008).

Viste tali premesse, il progetto di ricerca, in collaborazione con l'azienda F.Ili Pinna Industria Casearia s.p.a, aveva come obiettivo lo studio e l'identificazione di innovazioni tecnologiche da adottare per garantire la sicurezza alimentare di formaggi freschi a base di latte di pecora forniti dall'azienda stessa. Tra i formaggi freschi a base di latte ovino il "Primo sale" è uno dei prodotti più caratteristici, a breve stagionatura, con crosta morbida e pasta semidura. Tali caratteristiche tecnologiche e la composizione (pH, aw) conferiscono al Primo sale requisiti di permissività in grado di favorire, in presenza di contaminazioni, lo sviluppo di microrganismi alteranti o patogeni in misura tale da determinare casi di malattia alimentare (ad es. listeriosi) o il ritiro del prodotto dal commercio.

Le soluzioni proposte erano centrate sull'utilizzo di colture protettive nella produzione del Primo sale il che rappresenta una significativa innovazione rispetto alle attuali tecnologie adottate dalle imprese del comparto, con la prospettiva di una rapida integrazione delle stesse nei processi della produzione industriale e di commercializzazione. La coltura protettiva scelta per tale scopo era rappresentata da una coltura commerciale liofilizzata, *Listeria Dairy* (Holdbac, Danisco) a base di ceppi di *L. plantarum*. La scheda tecnica allegata alla coltura non forniva indicazioni circa il ceppo di *L. plantarum* utilizzato né sul meccanismo attraverso il quale tale coltura era in grado di inibire la crescita del patogeno contaminante. Pertanto, era necessario preliminarmente indagare sulle proprietà della coltura e caratterizzarne l'attività antimicrobica esercitata contro *L. monocytogenes*. Infatti, dopo aver ottenuto informazioni sulle condizioni di crescita ottimali della coltura protettiva, attraverso l'esecuzione di una curva di crescita in differenti mezzi di coltura, si è passati a cercare di capire quali fossero i presupposti necessari affinché la stessa potesse esercitare al massimo delle proprie potenzialità l'attività antibatterica rivolta contro *L. monocytogenes*. Gli studi esistenti a riguardo avevano già precedentemente dimostrato che la crescita di *L. plantarum* era direttamente influenzata da una serie di fattori, tra i quali le condizioni di pH, temperatura, composizione del mezzo e tasso di aerazione (Brinques et al., 2010). Quindi, partendo da questo presupposto si è valutata l'attività antilisterica esercitata dalla coltura protettiva in seguito all'incubazione in diversi mezzi di coltura osservando come tale attività antimicrobica fosse potenziata quando il *L. plantarum* veniva

preliminarmente incubato over night a 30°C in terreni ricchi di nutrienti come il Lactobacilli de Man Rogosa Sharpe Broth (MRS broth, BD Difco™). Dopo aver compreso quali erano le condizioni favorevoli affinché la coltura protettiva esercitasse il potenziale antimicrobico, si è proceduto a identificare la natura e il meccanismo d'azione del composto o dei composti responsabili di tale attività. Dall'analisi delle colture di *L. plantarum* è stato dedotto che l'attività antimicrobica fosse riconducibile alla presenza di una o più molecole presenti nel surnatante della coltura stessa. Si è ipotizzato che tali composti, di natura proteica, in quanto inibiti dall'azione delle proteasi, potessero essere riferibili ad una batteriocina. È noto, infatti, che il fenomeno dell'inibizione o dell'uccisione da parte dei batteri lattici di microrganismi strettamente correlati, patogeni o alteranti, sia mediato da una serie di fattori, tra i quali la produzione di batteriocine (Egan et al., 2016). Pertanto, per dimostrare tale ipotesi, il surnatante ottenuto da colture di *L. plantarum* è stato purificato e sottoposto ad analisi mediante spettrometria di massa, dalla quale si è evinta la presenza di una frazione proteica predominante, avente una massa di 4624 Da, simile alla massa della batteriocina Pediocina. Tale risultato conferma che il meccanismo d'azione coinvolto nell'attività antilisterica esercitata da *L. plantarum* è presumibilmente mediato dalla produzione di tale batteriocina e non da una Plantaricina, la quale viene prodotta molto più comunemente da questa specie di lattobacilli (Messi et al., 2001). Questo dato oltre ad essere stato dimostrato dall'associazione di una massa di 4624 +/-3 Da presente nel surnatante di *L. plantarum* con l'attività antilisterica dello stesso, conferma quanto presente in letteratura da studi condotti in precedenza. Infatti, Ennahar et al. nel 1996 descrivevano la produzione di Pediocina da ceppi di *L. plantarum* e successivamente Xie et al. nel 2011 isolavano un ceppo di *L. plantarum* produttore di una pediocina da un prodotto lattiero-caseario fermentato tradizionale cinese. L'ulteriore conferma di quanto precedentemente ipotizzato è stata ottenuta attraverso l'indagine molecolare della coltura liofilizzata di *L. plantarum* che ha portato all'amplificazione di un segmento del genoma delle dimensioni di circa 332bp, esattamente come il locus dei geni codificanti per la Pediocina presenti nel ceppo di *Pediococcus spp* produttore di pediocina, utilizzato come controllo positivo. Tale scoperta ha portato a ritenere che il ceppo di *L. plantarum*, contenuto nella coltura liofilizzata commerciale *Listeria Dairy* (Holdbac, Danisco), faccia parte di LAB geneticamente ingegnerizzati, dove le capacità adattative della coltura



batterica sono potenziate dalla presenza di geni responsabili della produzione di batteriocine le cui potenzialità antimicrobiche sono superiori rispetto a quelle prodotte dai batteri naturalmente (McAuliffe et al., 1999).

A questo punto si è valutato in che modo tale coltura potesse essere utilizzata in vivo per inibire la contaminazione da *L. monocytogenes* del formaggio fresco ovino Primo Sale. Infatti, vari autori hanno riferito che l'inattivazione di diversi agenti patogeni di origine alimentare da parte delle batteriocine può differire notevolmente a seconda della matrice alimentare utilizzata (Muñoz et al., 2007), pertanto, l'efficacia delle diverse batteriocine per i vari agenti patogeni di origine alimentare deve essere testata in tutti i sistemi alimentari. È stata quindi valutata la crescita di *L. plantarum* in diverse matrici (latte ovino, siero di latte ovino e scotta), al fine di individuare quella ideale per la creazione di una coltura madre da utilizzare nella produzione del formaggio con l'obiettivo di stabilire, in stretta collaborazione con l'azienda, in quale fase del processo produttivo del formaggio e in quale concentrazione fosse necessario aggiungere la coltura protettiva, per ottenere la maggior inibizione dello sviluppo di *L. monocytogenes*. Dopo aver appurato che la scotta fosse la matrice ideale a tale scopo, la stessa è stata utilizzata in caseificio per creare una coltura madre da inserire nel latte al momento della lavorazione del formaggio Primo Sale. Sono state quindi predisposte due differenti lavorazioni: il Primo Sale con l'aggiunta della scotta innesto contenente il *L. plantarum* e il Primo Sale senza la scotta innesto. I risultati preliminari emersi da tale Challenge test, che necessitano di ulteriori approfondimenti, fanno ben sperare sull'utilizzo di colture protettive a base di *L. plantarum* per ridurre il rischio di contaminazione da *L. monocytogenes* di prodotti freschi come il formaggio Primo Sale. Tuttavia, il potenziale di tale coltura, dimostrato in vitro, deve poter essere esplicito maggiormente in vivo. È necessario, infatti, trovare la formulazione giusta che consenta di far esprimere appieno l'attività antilisterica della coltura commerciale *Listeria Dairy* (Holdbac, Danisco) a base di *L. plantarum* e della batteriocina Pediocina da esso prodotta.

L'applicazione di LAB produttori di batteriocine o di batteriocine purificate come strategia di biocontrollo dei contaminanti alimentari rimane una sfida per il futuro. Le prospettive e i campi di applicazione sono vasti e promettenti, ma è necessario incrementare le conoscenze sia delle modalità d'azione sia delle condizioni ottimali affinché tali molecole esercitino appieno il loro potenziale antimicrobico. È quindi

essenziale incrementare lo studio e la ricerca di nuovi ceppi produttori di batteriocina e migliorare, mediante meccanismi di ingegneria genetica, la produzione di batteriocine da parte dei LAB. È indispensabile, inoltre, migliorare e semplificare i sistemi di produzione e purificazione delle batteriocine, sia in termini di costi che di procedure, il che sarà determinante per rendere il loro uso fattibile e commerciabile in futuro.

## CONCLUSIONI

La fase preliminare del progetto, svolta presso lo stabilimento caseario F.lli Pinna s.p.a., prevedeva la valutazione delle diverse fasi tecnologiche di produzione e dei parametri di processo e di prodotto in grado di influire sulla sicurezza del prodotto stesso. A tale scopo sono stati valutati i parametri chimico fisici e microbiologici del prodotto caseario, al fine di stabilire se lo stesso fosse in grado di supportare la crescita del microrganismo patogeno *L. monocytogenes*, secondo i criteri stabiliti dal Reg. CE 2073/2005. I risultati ottenuti dai campioni raccolti dai tre lotti di produzione del formaggio fresco ovino “Primo Sale” (siero, cagliata pre-salamoia, cagliata post-salamoia) hanno messo in evidenza come le caratteristiche intrinseche del prodotto, secondo i criteri microbiologici stabiliti nel Reg. CE 2073/2005, rendevano lo stesso permissivo alla potenziale contaminazione da parte di *L. monocytogenes*.

Tale dato è stato supportato dall’analisi microbiologica condotta secondo metodica qualitativa UNI EN ISO 11290-1:2017, che ha portato all’identificazione di un totale di 25 ceppi con caratteristiche di crescita tipiche riferibili al patogeno. In seguito, mediante indagine molecolare è stato confermato che le colonie sospette erano riferibili alla specie *Listeria innocua*. Seppur non patogena per l’uomo, la contaminazione dei campioni da parte di *L. innocua* dimostrava non solo che il prodotto supportava la crescita del microrganismo, e con buone probabilità, anche del patogeno *L. monocytogenes*, ma lasciava supporre anche la presenza di nicchie ecologiche all’interno dei locali di produzione, potenzialmente rischiose per la contaminazione post-processo dei prodotti.

Pertanto, per valutare il rischio di contaminazione del prodotto Primo Sale da *L. monocytogenes* è stato predisposto un programma di mappatura per individuare i potenziali siti di contaminazione presenti negli ambienti di lavorazione dello stabilimento caseario. Sono stati individuati cinque locali: salatura, stagionatura, lavaggio forme, stoccaggio (cella frigo 4°C) e confezionamento. In ciascuno dei quali, mediante l’ausilio di sponge sterili, si è proceduto al campionamento ambientale delle superfici a contatto e non a contatto con l’alimento. L’analisi microbiologica per la valutazione del livello di contaminazione da *L. monocytogenes* (UNI EN ISO 11290-01:2017) ha messo in evidenza che delle 286 colonie isolate il 51% appartenevano alla specie *L. monocytogenes*, la maggior parte delle quali appartenenti al sierotipo 4b (quello maggiormente diffuso in natura).

Questo dato dava un'idea circa il livello di contaminazione da *L. monocytogenes* dei vari locali dello stabilimento caseario ponendo l'attenzione sulla necessità di adottare tutte le misure necessarie per ridurre il rischio di contaminazione post-processo del prodotto.

Successivamente nella seconda fase del progetto sono stati eseguiti una serie di esperimenti preliminari al challenge test, con lo scopo di individuare le strategie applicabili per inibire o ridurre la contaminazione del formaggio fresco a base di latte ovino "Primo Sale" da parte di *L. monocytogenes*. È stata, pertanto, presa in considerazione l'idea dell'utilizzo di una coltura protettiva commerciale, *Listeria Dairy* (Holbac, Danisco) a base di una coltura liofilizzata di *Lactobacillus plantarum*.

La parte preliminare consisteva innanzitutto nell'acquisire una serie di informazioni e dati relativi alle condizioni di crescita sia del patogeno *L. monocytogenes*, sia della coltura protettiva utilizzata. Sono stati quindi selezionati quattro ceppi di *L. monocytogenes* appartenenti a diversi sierotipi, tre di essi derivanti dal campionamento ambientale dei locali dello stabilimento caseario, più un ceppo di riferimento. Per valutare il tempo necessario ai diversi ceppi per raggiungere la fase pre-stazionaria di crescita (circa  $10^9$  UFC/ml), fase alla quale i ceppi venivano utilizzati nei successivi esperimenti di challenge, è stata allestita per ciascuno di essi una curva di crescita a tre differenti temperature di incubazione: 30°C e 4°C, rispettivamente la temperatura ottimale di crescita del patogeno e la temperatura di conservazione del formaggio e 10°C per simulare un non corretto mantenimento della catena del freddo come potenzialmente ipotizzato nella conservazione domestica. È evidente come a seconda della temperatura di incubazione le colture dei ceppi di *L. monocytogenes* abbiano raggiunto la fase pre-stazionaria di crescita in tempi diversi: 20 ore per i ceppi incubati a 30°C; 9 giorni per i ceppi incubati a 10°C e circa 22 giorni per i ceppi incubati a 4°C.

Stessa procedura è stata utilizzata per valutare la crescita della coltura protettiva di *L. plantarum*.

La curva di crescita della coltura liofilizzata di *L. plantarum* è stata eseguita seguendo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice (*Listeria Dairy*, Danisco Holdbac) in modo da avere una carica batterica iniziale di  $10^2$  UFC/ml. In questo caso la coltura era in grado di raggiungere la fase pre-stazionaria di crescita dopo 18 ore di incubazione a 30°C.

A questo punto, per capire in che modo la coltura liofilizzata commerciale di *Lactobacillus plantarum* (*Listeria Dairy*, Danisco Holdbac) fosse in grado di esercitare la sua attività antilisterica e per valutare se questa fosse influenzata dal mezzo di coltura nel quale il lattobacillo veniva fatto crescere, sono stati allestiti una serie di esperimenti allo scopo di caratterizzare l'attività antilisterica esercitata dal *L. plantarum*. Pertanto, le colture di *L. plantarum* sono state realizzate utilizzando tre diversi substrati: soluzione fisiologica (Na Cl 0,85%), Tripton Soy Broth (TSB BD Difco™) Lactobacilli de Man Rogosa Sharpe Broth (MRS broth, BD Difco™) e come ceppi indicatori nei saggi di attività antilisterica sono stati utilizzati tre diversi ceppi di *Listeria monocytogenes* (provenienti dalla collezione del Dipartimento di IAOA), appartenenti a tre diversi sierotipi (1/2b, 1/2c, 4b), più un ceppo di riferimento appartenente al sierotipo 1/2 b.

Quando la coltura liofilizzata di *L. plantarum* è stata risospesa in soluzione fisiologica, è stata utilizzata immediatamente nei saggi di valutazione dell'attività antilisterica, mentre quando sono stati utilizzati come mezzi di crescita il TSB e il MRS broth, la coltura di *L. plantarum* è stata incubata a 30 °C per 18 ore prima del suo uso sperimentale (temperatura e tempo di incubazione che consentono il raggiungimento di una carica batterica pari a 10<sup>9</sup> UFC/ml). I risultati hanno mostrato che il mezzo nel quale il *L. plantarum* veniva inoculato aveva un ruolo importante nell'esplicare l'attività antilisterica. Infatti, quando la coltura di *L. plantarum* veniva inoculata in soluzione fisiologica (NaCl 0,85%) non si evidenziava alcuna inibizione della crescita dei ceppi indicatori di *L. monocytogenes* presenti nel terreno. Al contrario era presente una spiccata attività antilisterica in corrispondenza dei pozzetti nei quali era presente la coltura di *L. plantarum* incubata nei due brodi di coltura prima del suo utilizzo. Questo risultato ha portato ad ipotizzare che la coltura protettiva utilizzata tal quale non fosse in grado di esercitare alcuna attività antilisterica, mentre la stessa possa essere esplicata solo quando la coltura ha raggiunto la fase pre-stazionaria di crescita, fase alla quale probabilmente è in grado di produrre in quantità adeguate le molecole con attività listericida.

Dopo aver compreso quali erano le condizioni favorevoli affinché la coltura protettiva esercitasse l'attività antilisterica, si è andati avanti per identificare la natura e il meccanismo d'azione del composto o dei composti responsabili di tale attività. In prima istanza, per capire se l'attività antilisterica fosse legata alla

componente cellulare o fosse determinata dal rilascio di una qualche molecola nel surnatante della coltura cellulare, è stato ottenuto un surnatante privo di cellule (CFS, Cell Free Supernatant) a partire dalle colture over night di *L. plantarum*, che è stato successivamente testato in saggi di diffusione su piastra (AWDA). Tale CFS, messo a contatto con gli stessi ceppi indicatori di *L. monocytogenes* utilizzati negli esperimenti precedenti, ha mostrato un potere antilisterico addirittura superiore alla coltura protettiva utilizzata tal quale, avvalorando la tesi che il composto ad attività antilisterica fosse prodotto dalle cellule di *L. plantarum* in seguito al raggiungimento della fase pre- stazionaria di crescita e successivamente secreto nel surnatante. Per capire se l'inibizione della crescita del patogeno indicatore non fosse in qualche modo influenzata anche dal pH del CFS, si è deciso di procedere con la correzione a valori di neutralità e l'effetto inibitorio è rimasto invariato. Inoltre, per indagare sulla natura del composto con attività antimicrobica presente nel surnatante, lo stesso è stato trattato con delle proteasi, proteinasi K (33 U mg<sup>-1</sup>) e tripsina (105 U mg<sup>-1</sup>) (Sigma- Aldrich Corporation, USA), in grado di degradare la componente proteica presente. Il CFS così trattato è stato utilizzato in saggi di AWDA che hanno dimostrato come venisse completamente persa l'attività antilisterica, a dimostrazione del fatto che il composto responsabile di tale attività fosse di natura proteica.

A questo punto, per avere un'indicazione sulla natura del composto o sui composti responsabili dell'attività antilisterica esercitata da *L. plantarum*, si è proceduto con la purificazione della coltura e successiva analisi mediante HPLC, attività condotta durante lo stage presso i laboratori della Teagasc sotto la supervisione della Dott.ssa Paula O'Connor.

È stata condotta un'analisi separata per il pellet cellulare e per il surnatante che ha portato a confermare le ipotesi iniziali, ossia la tesi che l'antimicrobico presente non fosse associato alle cellule ma venisse probabilmente secreto nel surnatante dalla coltura batterica. Dall'analisi del surnatante, che mostrava una spiccata attività antilisterica, si evinceva la presenza di una frazione proteica predominante, che possedeva una massa di circa 4624 Da, simile alla massa della batteriocina Pediocina.

I risultati ottenuti portavano quindi a supporre con maggiore certezza che il meccanismo d'azione dell'attività antilisterica esercitata da *L. plantarum* fosse legato alla produzione e secrezione della batteriocina Pediocina e non da una

Plantaricina, la quale viene prodotta molto più comunemente da questo genere di lattobacilli. Questo dato è stato dimostrato da diverse evidenze:

- a) l'associazione di una massa di 4624 +/-3 Da presente nel surnatante di *L. plantarum* con l'attività antilisterica dello stesso. Dato confermato dalla bibliografia, come lo studio di Ennahar et al. (1996) nel quale viene riportata la produzione di pediocina da parte di *L. plantarum*;
- b) nei saggi di AWDA, in prossimità degli aloni di inibizione della *L. monocytogenes* si notavano delle colonie sparse cresciute nell'area del pozzetto nel quale era presente la sospensione con le batteriocine prodotte. Questo suggerisce che, soprattutto aumentando il tempo di incubazione delle piastre nelle quali il ceppo indicatore *L. monocytogenes* è a contatto con l'azione inibente esercitata dalle batteriocine, si sviluppava una sorta di resistenza antimicrobica da parte del patogeno e questo fenomeno è stato particolarmente descritto per le batteriocine di classe Ia come la Pediocina (Gravesen, A., et al. 2002);
- c) la Pediocina non risulta essere associata alle cellule e questo spiega perché non fosse presente un'attività antilisterica stabile dall'estratto cellulare ottenuto dalle colture di *L. plantarum*.

Per consolidare la teoria emersa dall'analisi del surnatante prodotto da *L. plantarum*, secondo cui la coltura sarebbe in grado di produrre e liberare una sostanza di natura proteica con attività antilisterica, correlata alla batteriocina Pediocina, è stata condotta un'indagine molecolare sugli isolati ottenuti dalla coltura liofilizzata di *L. plantarum* che ha portato all'amplificazione di un segmento del genoma di *L. plantarum*, delle dimensioni di circa 332bp, esattamente come il locus dei geni codificanti per la Pediocina presenti nel ceppo di *Pediococcus spp* produttore di pediocina, utilizzato come controllo positivo.

Dopo aver acquisito le informazioni preliminari riguardo il meccanismo con il quale *L. plantarum* fosse in grado di esercitare la propria attività antilisterica, si è valutato in che modo tale coltura potesse essere utilizzata in vivo per inibire la contaminazione da *L. monocytogenes* del formaggio fresco oggetto della sperimentazione. È stata quindi valutata la crescita di *L. plantarum* in diverse matrici (latte ovino, siero di latte ovino e scotta), al fine di individuare quella ideale per la creazione di una coltura madre, da utilizzare nella produzione del formaggio con l'obiettivo di stabilire, in stretta collaborazione con l'azienda, in quale fase del

processo produttivo del formaggio e in quale concentrazione fosse necessario aggiungere la coltura protettiva, per ottenere la maggior inibizione dello sviluppo di *L. monocytogenes*. I risultati ottenuti dalle prove sperimentali in vitro hanno dimostrato come la matrice ideale a tale scopo fosse rappresentata dalla scotta, nella quale la coltura protettiva di *L. plantarum* era in grado di raggiungere la fase pre-stazionaria di crescita dopo 12 ore di incubazione a 37°C. Tale matrice è stata quindi utilizzata in caseificio per creare una coltura madre da inserire nel latte al momento della lavorazione del formaggio Primo Sale.

Per tre lotti di produzione, è stata predisposta la lavorazione di due differenti preparazioni:

- il Primo Sale con l'aggiunta della scotta innesto contenente il *L. plantarum*;
- il Primo Sale senza la scotta innesto.

I risultati hanno mostrato come pH e temperatura mantenevano valori pressoché costanti nei campioni derivanti dalle due tipologie di preparazioni, mentre la conta dei lattobacilli fosse molto variabile, sia per il formaggio preparato con l'aggiunta della scotta innesto, sia per quello preparato senza. Chiaramente, i microrganismi cresciuti nelle piastre potevano essere riconducibili sia al *L. plantarum* aggiunto con la scotta innesto, sia ai microrganismi presenti nel latte, nel caglio microbico utilizzato e negli impianti di lavorazione.

I risultati delle analisi condotte con metodica quantitativa sul prodotto finito (spicchi di formaggio addizionati con coltura protettiva; spicchi di formaggio addizionati con coltura protettiva e con *Listeria monocytogenes*; spicchi di formaggio controllo, non addizionati con coltura protettiva e inoculati con *L. monocytogenes*; spicchi di formaggio controllo, non addizionati con coltura protettiva) stoccato alle differenti temperature hanno messo in evidenza come, per tutti e tre i lotti campionati era apprezzabile una lieve riduzione del livello di contaminazione sperimentale da *L. monocytogenes* riguardante solo i campioni addizionati della coltura protettiva di *L. plantarum* presente nella scotta innesto (Ps +Lpl), mentre nei campioni prodotti senza l'aggiunta della coltura protettiva (Ps) si registrava un incremento del livello di contaminazione del patogeno. Tale andamento era paragonabile per le due temperature di stoccaggio: 4°C e 10°C. Al contrario, nell'analisi con la metodica qualitativa, soprattutto nel primo e secondo lotto non erano apprezzabili variazioni del livello di contaminazione da *L. monocytogenes* tra i campioni addizionati della coltura protettiva (Ps +Lpl) e i



campioni prodotti senza l'aggiunta della coltura protettiva (Ps). Questi risultati, che necessitano di ulteriori approfondimenti, fanno comunque ben sperare sull'utilizzo di colture protettive a base di colture di *L. plantarum* per ridurre il rischio di contaminazione da *L. monocytogenes* di prodotti freschi come il formaggio Primo Sale. Il potenziale di tale coltura, dimostrato in vitro, deve poter essere esplicito maggiormente in vivo pertanto sono necessari ulteriori approfondimenti per trovare la formulazione giusta che consenta di far esprimere appieno l'attività antilisterica della coltura commerciale *Listeria Dairy* (Holdbac, Danisco) a base di *L. plantarum* e della batteriocina Pediocina, prodotta da questo ceppo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abdollahzadeh, E., Ojagh, S. M., Hosseini, H., Ghaemi, E. A., Irajian, G., & Heidarlo, M. N. (2016). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood and humans in Iran. *Microbial Pathogenesis*, *100*, 70-74.
2. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) (2000). Rapport de la commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes*. (July 2000). Maisons-Alfort, France: AFSSA, 2000:64.
3. Ahmad, V., Khan, M. S., Jamal, Q. M. S., Alzohairy, M. A., Al Karaawi, M. A., & Siddiqui, M. U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *49*(1), 1-11.
4. Almeida, G., Magalhães, R., Carneiro, L., Santos, I., Silva, J., Ferreira, V., ... & Teixeira, P. (2013). Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. *International Journal of Food Microbiology*, *167*(3), 303-309.
5. Almeida, G., Magalhães, R., Carneiro, L., Santos, I., Silva, J., Ferreira, V., ... & Teixeira, P. (2013). Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. *International Journal of Food Microbiology*, *167*(3), 303-309.
6. Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied microbiology and biotechnology*, *100*(7), 2939-2951.
7. Alves, V. F., Martínez, R. C. R., Lavrador, M. A. S., & De Martinis, E. C. P. (2006). Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. *Meat Science*, *74*(4), 623-627.
8. Amaya-Villar R., García-Cabrera E., Sulleiro-Igual E., Fernández-Viladrich P., Fontanals-Aymerich D., Catalán-Alonso P., Rodrigo-GonzalodeLiria C., Coloma-Conde A., Grill-Díaz F., Guerrero-Espejo A., Pachón J., Prats-Pastor G. (2010). Three-year multicenter surveillance of community-acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in adults. *BMC Infectious Diseases*, *10*:324.
9. And, H. C., & Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *2*(3), 82-100.
10. Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Ilavenil, S., Choi, K. C., & Srigopalram, S. (2016). In vitro importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field. *Saudi journal of biological sciences*, *23*(1), S6-S10.
11. Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A. J. G., Lebrihi, A., & Lefebvre, G. (2001). Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced

- by *Lactobacillus plantarum* C19. *International Journal of Food Microbiology*, 68(1-2), 93-104.
12. Bae, D., Mezal, E. H., Smiley, R. D., Cheng, C. M., & Khan, A. A. (2014). The sub-species characterization and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from domestic and imported food products from 2004 to 2011. *Food research international*, 64, 656-663.
  13. Belessi, C. E. A., Gounadaki, A. S., Schwartzman, S., Jordan, K., & Skandamis, P. N. (2011). Evaluation of growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* growing on stainless steel surfaces, detached from biofilms or in suspension, in response to pH and NaCl. *International journal of food microbiology*, 145, S53-S60.
  14. Bergey, D. H. (2001). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
  15. Blin, K., Medema, M. H., Kazempour, D., Fischbach, M. A., Breitling, R., Takano, E., & Weber, T. (2013). antiSMASH 2.0—a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic acids research*, 41(W1), W204-W212.
  16. Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Júnior, A. F., Júnior, J. A., Tsunemi, M. H., & Rall, V. L. M. (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food control*, 35(1), 386-391.
  17. Booth, I. R. (1998). Bacterial responses to osmotic stress: diverse mechanisms to achieve a common goal. *The Properties of Water in Foods ISOPOW 6*, 456-485.
  18. Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., & Call, D. R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 7336-7342.
  19. Bosch, M., Rodriguez, M., Garcia, F., Fernández, E., Fuentes, M. C., & Cune, J. (2012). Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 and CECT 7316 isolated from faeces of healthy children. *Letters in applied microbiology*, 54(3), 240-246.
  20. Brinques, G. B., do Carmo Peralba, M., & Ayub, M. A. Z. (2010). Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(2), 205-212.
  21. Buchanan, R. L., Gorris, L. G., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food control*, 75, 1-13.
  22. CAC (2009). Codex Alimentarius Commission. Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods CAC/GL 61 – 2007 (last modified 2009). Available at: <http://www.fao.org/faowhocodexalimentarius/standards/list-of-standards/en>.

23. Calderón-González, R., Frande-Cabanes, E., Bronchalo-Vicente, L., Lecea-Cuello, M. J., Pareja, E., Bosch-Martínez, A., ... & Álvarez-Domínguez, C. (2014). Cellular vaccines in listeriosis: role of the *Listeria* antigen GAPDH. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 22.
24. Campagnollo, F. B., Gonzales-Barron, U., Cadavez, V. A. P., Sant'Ana, A. S., & Schaffner, D. W. (2018). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in traditional Minas cheeses: The cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses. *Food control*, 92, 370-379.
25. Carpentier B. & Cerf O. (2011). Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology* Volume 145, Issue 1, 31 January 2011, Pages 1-8.
26. Castanon, J. I. R. (2007). History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry science*, 86(11), 2466-2471.
27. Cebeci, A., & Gürakan, C. (2003). Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food microbiology*, 20(5), 511-518.
28. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2008). Outbreak of *Listeria monocytogenes* infections associated with pasteurized milk from a local dairy--Massachusetts, 2007. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 57(40), 1097-1100.
29. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2012). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Imported Frescolina Marte Brand Ricotta Salata Cheese. September 27, 2012 5:15 *PMET*, [www.cdc.gov/outbreaknet/outbreaks.html](http://www.cdc.gov/outbreaknet/outbreaks.html)
30. Chakraborty, T., Leimeister-Wächter, M., Domann, E., Hartl, M., Goebel, W., Nichterlein, T., & Notermans, S. (1992). Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *Journal of bacteriology*, 174(2), 568-574.
31. Chasseignaux, E., Toquin, M. T., Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P., & Ermel, G. (2001). Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry-and pork-processing plants. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), 888-899.
32. Chen, Y., Ludescher, R. D., & Montville, T. J. (1997). Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4770-4777.
33. Chen, Y., Luo, Y., Curry, P., Timme, R., Melka, D., Doyle, M., ... & Strain, E. A. (2017). Assessing the genome level diversity of *Listeria monocytogenes* from contaminated ice cream and environmental samples linked to a listeriosis outbreak in the United States. *PLoS One*, 12(2), e0171389.
34. Chung, K. T., Dickson, J. S., & Crouse, J. D. (1989). Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(6), 1329-1333.

35. Ciccio, P. D., Conter, M., Ianieri, A., D'Orio, V., & Vergara, A. (2009). Pathogenicity and virulence factors of *Listeria monocytogenes*. *Industrie Alimentari*, 48(497), 35-39.
36. Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F., & Hernández, P. E. (2001). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International*, 7(4), 281-305.
37. Cintas, L. M., Casaus, P., Fernández, M. F., & Hernández, P. E. (1998). Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiology*, 15(3), 289-298.
38. Ciolacu, L., Nicolau, A. I., Wagner, M., & Rychli, K. (2015). *Listeria monocytogenes* isolated from food samples from a Romanian black market show distinct virulence profiles. *International Journal of Food Microbiology*, 209, 44-51.
39. Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International journal of food microbiology*, 71(1), 1-20.
40. Cossart, P., & Toledo-Arana, A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes and infection*, 10(9), 1041-1050.
41. Cotter, P. D., & Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(3), 429-453.
42. Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777-788.
43. Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Alvarez-Ordóñez, A. (2016). New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in microbiology*, 7, 1641.
44. Crépet, A., Albert, I., Dervin, C., & Carlin, F. (2007). Estimation of microbial contamination of food from prevalence and concentration data: application to *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables. *Applied and environmental microbiology*, 73(1), 250-258.
45. D'amico, D. J., Druart, M. J., and Donnelly, C. W. (2008) "60-day aging requirement does not ensure safety of surface-mold-ripened soft cheeses manufactured from raw or pasteurized milk when *Listeria monocytogenes* is introduced as a postprocessing contaminant." *Journal of Food Protection* 71.8: 1563-1571.
46. da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., & de Souza Oliveira, R. P. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 527-536.
47. Davoodabadi, A., Dallal, M. M. S., Foroushani, A. R., Douraghi, M., & Harati, F. A. (2015). Antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria. *Anaerobe*, 34, 53-58.
48. De Cesare, A., Bruce, J. L., Dambaugh, T. R., Guerzoni, M. E., & Wiedmann, M. (2001). Automated ribotyping using different enzymes to improve discrimination of *Listeria*

*monocytogenes* isolates, with a particular focus on serotype 4b strains. *Journal of clinical microbiology*, 39(8), 3002-3005.

49. De Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (2006). *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16(9), 1018-1028.
50. Decisione di esecuzione (UE) 2018/945 della commissione del 22 giugno 2018 relativa alle malattie trasmissibili e ai problemi sanitari speciali connessi da incorporare nella sorveglianza epidemiologica, nonché alle pertinenti definizioni di caso.
51. Decreto Legislativo 4 aprile 2006, n. 191. "Attuazione della direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici" pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 119 del 24 maggio 2006 .
52. Delgado, A., López, F. N. A., Brito, D., Peres, C., Fevereiro, P., & Garrido-Fernández, A. (2007). Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2 b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. *Journal of Biotechnology*, 130(2), 193-201.
53. Dembélé, T., Odrálek, V., & Votava, M. (1998). Inhibition of bacterial pathogens by lactobacilli. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 288(3), 395-401.
54. Desai, A. N., Anyoha, A., Madoff, L. C., & Lassmann, B. (2019). Changing epidemiology of *Listeria monocytogenes* outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: A review of ProMED reports from 1996 to 2018. *International Journal of Infectious Diseases*, 84, 48-53.
55. Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Shabbir, M. Z., Barbuddhe, S., Malik, S.V., Singh, R.K. (2015). Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Vet Q*;35(4):211-35. Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003, on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC. OJ L 325/31, 12.12.2003.
56. Dramsi, S., Bourdichon, F., Cabanes, D., Lecuit, M., Fsihi, H., & Cossart, P. (2004). FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Molecular microbiology*, 53(2), 639-649.
57. Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., & Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70(2), 564-582.
58. Du, X. J., Zhang, X., Wang, X. Y., Su, Y. L., Li, P., & Wang, S. (2017). Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* in Chinese food obtained from the central area of China. *Food Control*, 74, 9-16.
59. Dubourg, G., Elsawi, Z., & Raoult, D. (2015). Assessment of the in vitro antimicrobial activity of *Lactobacillus* species for identifying new potential antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(5), 590-593.

60. Duffes, F., Jenoe, P., & Boyaval, P. (2000). Use of two-dimensional electrophoresis to study differential protein expression in divercin V41-resistant and wild-type strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 66(10), 4318-4324.
61. Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and drug resistance*, 8, 49.
62. EFSA (2007). Scientific committee. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *The EFSA Journal* 587, 1-16.
63. EFSA (2008) European Food Safety Authority. Foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. Scientific opinion of the panel on biological hazards. Question N. EFSA-Q-2007-089 *EFSA J.* 765, 1-87.
64. EFSA & ECDC (2015). European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 13(12):4329, 191.
65. EFSA & ECDC (2015). European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, 13(12), 4329.
66. EFSA & ECDC (2016). European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*;14(12):4634, 231 pp.
67. EFSA & ECDC (2019) European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority), 2019. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* clonal complex 8 infections linked to consumption of cold- smoked fish products. *EFSA Supporting Publications 2019; EN1665*.
68. EFSA & ECDC (2021). European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2021;19(12):6971.
69. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards) (2020). Koutsoumanis K, Alvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, De Cesare A, Herman L, Hilbert F, Lindqvist R, Nauta M, Peixe L, Ru G, Simmons M, Skandamis P, Suffredini E, Jordan K, Sampers I, Wagner M, Da Silva Felicio MT, Georgiadis M, Messens W, Mosbach-Schulz O and Allende A, 2020c. The public health risk posed by *Listeria monocytogenes* in frozen fruit and vegetables including herbs, blanched during processing. *EFSA Journal*;18(4):6092, 102 pp.
70. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., ... & Lindqvist, R. (2018). *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA journal*, 16(1), e05134.

71. EFSA, & ECDC (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14(12), e04634.
72. EFSA, & ECDC (2019). European Centre for Disease Prevention and Control, and European Food Safety Authority. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* clonal complex 8 infections linked to consumption of cold-smoked fish products. *EFSA Journal* Vol. 16. No. 6.
73. Egan, K., Field, D., Rea, M. C., Ross, R. P., Hill, C., & Cotter, P. D. (2016). Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems?. *Frontiers in Microbiology*, 7, 461.
74. Eijsink, V. G., Skeie, M., Middelhoven, P. H., Brurberg, M. B., & Nes, I. F. (1998). Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3275-3281.
75. Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A. L. A. I. N., Bringel, F., Hubert, J. C., & Hasselmann, C. (1996). Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. *Applied and environmental microbiology*, 62(12), 4381-4387.
76. EURL Lm (2008). European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*. Guidance document on *Listeria monocytogenes* shelf- life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.  
[http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/guidoc\\_listeria\\_monocytogenes\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/guidoc_listeria_monocytogenes_en.pdf).
77. European Commission (2013). Commission staff working document – guidance document on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) N. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.  
[http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/translation\\_guidance\\_lm\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/translation_guidance_lm_en.pdf).
78. European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2011). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA Journal*, 9(3):2090, 378 pp.
79. European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2009). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2007. *EFSA Journal*, 7(1):223, 350 pp.
80. Fabbi M., Andreoli G., De Giuli L., Carretto E. (2005) “*Listeria monocytogenes*” in “Trattato sulle tossinfezioni alimentari”. pp.357-389, edited by Rondanelli E.G., Fabbi M., Marone P., ed *Selecta Medica*.
81. Fallah, A. A., Saei-Dehkordi, S. S., & Mahzounieh, M. (2013). Occurrence and antibiotic resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood products and market and processing environments in Iran. *Food control*, 34(2), 630-636.



82. Farber J.M., Peterkin P.I. (1999). Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. *Listeria, listeriosis and food safety 2nd edition*, E.T. Ryser and E.H. Marth, Marcel Dekker, New York, 505-564.
83. Farber, J. M., & Peterkin, P. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological reviews*, 55(3), 476-511.
84. Farber, J. M., Kozak, G. K., & Duquette, S. (2011). Changing regulation: Canada's new thinking on *Listeria*. *Food Control*, 22(9), 1506-1509.
85. 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>.
86. Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of food protection*, 77(1), 150-170.
87. Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonald, K. L., Brondum, J., Hayes, P. S., Plikaytis, B. D., ... & Reingold, A. L. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England journal of medicine*, 312(7), 404-407.
88. Gaillard, J. L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S., & Sansonetti, P. (1987). In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infection and immunity*, 55(11), 2822-2829.
89. Gálvez, A., López, R. L., Pulido, R. P., & Burgos, M. J. G. (2014). Natural antimicrobials for food biopreservation. In *Food biopreservation* (pp. 3-14). Springer, New York, NY.
90. Garrec, N., Picard-Bonnaud, F., & Pourcher, A. M. (2003). Occurrence of *Listeria sp.* and *L. monocytogenes* in sewage sludge used for land application: effect of dewatering, liming and storage in tank on survival of *Listeria* species. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35(3), 275-283.
91. Garrido, V., García-Jalón, I., & Vitas, A. I. (2010). Temperature distribution in Spanish domestic refrigerators and its effect on *Listeria monocytogenes* growth in sliced ready-to-eat ham. *Food Control*, 21(6), 896-901.
92. Gay, M., & Amgar, A. (2005). Factors moderating *Listeria monocytogenes* growth in raw milk and in soft cheese made from raw milk. *Le Lait*, 85(3), 153-170.
93. Gedde, M. M., Higgins, D. E., Tilney, L. G., & Portnoy, D. A. (2000). Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infection and immunity*, 68(2), 999-1003.
94. Ghairi, T., Chaftar, N., & Hani, K. (2012). Bacteriocins: recent advances and opportunities. *Progress in Food Preservation*, 485-511.
95. Gnanou Besse, N., Dubois Brissonnet, F., Lafarge, V., & Leclerc, V. (2000). Effect of various environmental parameters on the recovery of sublethally salt-damaged and acid-damaged *Listeria monocytogenes*. *Journal of applied microbiology*, 89(6), 944-950.

96. Goebel W., Kreft J., Bockmann R. (2000). Regulation of virulence genes in pathogenic *Listeria* spp. *Gram-positive pathogens, American society for microbiology, Washington DC*, 499-506.
97. Gómez, D., Azón, E., Marco, N., Carramiñana, J. J., Rota, C., Ariño, A., & Yangüela, J. (2014). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food microbiology*, 42, 61-65.
98. Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre souches de colibacille. *C. R. Soc. Biol.*, 93, 1040-1041.
99. Gray, M. L., & Killinger, A. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological reviews*, 30(2), 309-382.
100. Griffiths M.W. (2003). *Listeria*, properties and occurrence. *Encyclopedia of food sciences and nutrition, edited by Caballero B, Trugo LC, Finglas*, 3562-3581, 2nd edition, vol.6. Academic press.
101. Haakensen, M., Dobson, C. M., Hill, J. E., & Ziola, B. (2009). Reclassification of *Pediococcus dextrinicus* (Coster and White 1964) Back 1978 (Approved Lists 1980) as *Lactobacillus dextrinicus* comb. nov., and emended description of the genus *Lactobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(3), 615-621.
102. Hammes, W. P., & Vogel, R. F. (1995). The genus *Lactobacillus*. In *The genera of lactic acid bacteria* (pp. 19-54). Springer, Boston, MA.
103. Heng, N. C., Burtenshaw, G. A., Jack, R. W., & Tagg, J. R. (2007). Ubericin A, a class IIa bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Applied and environmental microbiology*, 73(23), 7763-7766.
104. Holzapfel, W. H., Geisen, R., & Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International journal of food microbiology*, 24(3), 343-362.
105. Hu, M., Zhao, H., Zhang, C., Yu, J., & Lu, Z. (2013). Purification and characterization of plantaricin 163, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 163 isolated from traditional Chinese fermented vegetables. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(47), 11676-11682.
106. Hutchison, M. L., Walters, L. D., Moore, T., Thomas, D. J. I., & Avery, S. M. (2005). Fate of pathogens present in livestock wastes spread onto fescue plots. *Applied and environmental microbiology*, 71(2), 691-696.
107. Jack, Ralph W., John R. Tagg, and Bibek Ray. "Bacteriocins of gram-positive bacteria." *Microbiological reviews* 59.2 (1995): 171-200.
108. Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A. & Wollman, E. L. (1953). Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur*, 84, 222-224.

109. Jallewar, P. K., Kalorey, D. R., Kurkure, N. V., Pande, V. V., & Barbuddhe, S. B. (2007). Genotypic characterization of *Listeria* spp. isolated from fresh water fish. *International Journal of Food Microbiology*, *114*(1), 120-123.
110. Jamuna, M., & Jeevaratnam, K. (2004). Isolation and partial characterization of bacteriocins from *Pediococcus* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*(4), 433-439.
111. Jiang, Z., Neetoo, H., & Chen, H. (2011). Efficacy of freezing, frozen storage and edible antimicrobial coatings used in combination for control of *Listeria monocytogenes* on roasted turkey stored at chiller temperatures. *Food microbiology*, *28*(7), 1394-1401.
112. Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., & Cossart, P. (2002). An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell*, *110*(5), 551-561.
113. Kampelmacher, E. H., & van Noorle Jansen, L. M. (1980). Listeriosis in humans and animals in the Netherlands (1958–1977). *Zentralblatt für Bakteriologie. I. Abt. Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie*, *246*(2), 211-227.
114. Khorshidian, N., Khanniri, E., Mohammadi, M., Mortazavian, A. M., & Yousefi, M. (2021). Antibacterial Activity of Pediocin and Pediocin-Producing Bacteria Against *Listeria monocytogenes* in Meat Products. *Frontiers in microbiology*, *2657*.
115. Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., ... & Siezen, R. J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(4), 1990-1995.
116. Koch, J., & Stark, K. (2006). Significant increase of listeriosis in Germany-epidemiological patterns 2001-2005. *Eurosurveillance*, *11*(6), 7-8.
117. Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., & Cossart, P. (1992). *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell*, *68*(3), 521-531.
118. Koistinen, K. M., Plumed-Ferrer, C., Lehesranta, S. J., Kärenlampi, S. O., & Von Wright, A. (2007). Comparison of growth-phase-dependent cytosolic proteomes of two *Lactobacillus plantarum* strains used in food and feed fermentations. *FEMS microbiology letters*, *273*(1), 12-21.
119. Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., & Drosinos, E. H. (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food control*, *21*(6), 805-815.
120. Kreft, J., & Vázquez-Boland, J. A. (2001). Regulation of virulence genes in *Listeria*. *International Journal of Medical Microbiology*, *291*(2), 145-157.
121. Kumar, V., Sheoran, P., Gupta, A., Yadav, J., & Tiwari, S. K. (2016). Antibacterial property of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LD4 isolated from a fermented food. *Annals of Microbiology*, *66*(4), 1431-1440.

122. Lan, W. T., Chen, Y. S., Wu, H. C., & Yanagida, F. (2012). Bio-protective potential of lactic acid bacteria isolated from fermented wax gourd. *Folia Microbiologica*, 57(2), 99-105.
123. Latorre, A. A., Pradhan, A. K., Van Kessel, J. A. S., Karns, J. S., Boor, K. J., Rice, D. H., ... & Schukken, Y. H. (2011). Quantitative risk assessment of listeriosis due to consumption of raw milk. *Journal of food protection*, 74(8), 1268-1281.
124. Latorre, A. A., Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Zurakowski, M. J., Pradhan, A. K., Boor, K. J., ... & Schukken, Y. H. (2010). Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Journal of dairy science*, 93(6), 2792-2802.
125. Leal-Sánchez, M.V., Jiménez-Díaz, R., Maldonado-Barragán, A., Garrido-Fernández, A., Ruiz-Barba, J. L. (2002). Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Appl Environ Microbiol*: 68 9 4465 4471.
126. Lee, S., Chen, Y., Gorski, L., Ward, T. J., Osborne, J., & Kathariou, S. (2018). *Listeria monocytogenes* source distribution analysis indicates regional heterogeneity and ecological niche preference among serotype 4b clones. *MBio*, 9(2), e00396-18.
127. Leite, P., Rodrigues, R., Ferreira, M., Ribeiro, G., Jacquet, C., Martin, P. and Brito, L. (2005). Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. *International Journal of Food Microbiology* 106(2): 111-121.
128. Leroy, F., & De Vuyst, L. (2010). Bacteriocins of lactic acid bacteria to combat undesirable bacteria in dairy products. *Australian journal of dairy technology*, 65(3), 143-149.
129. Linton, M., Mackle, A. B., Upadhyay, V. K., Kelly, A. L., & Patterson, M. F. (2008). The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Camembert-type cheese: A comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure. *Innovative food science & emerging technologies*, 9(4), 423-428.
130. Linton, R. H., Webster, J. B., Pierson, M. D., Bishop, J. R., & Hackney, C. R. (1992). The effect of sublethal heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection*, 55(2), 84-87.
131. Lomonaco, S., Decastelli, L., Nucera, D., Gallina, S., Bianchi, D. M., & Civera, T. (2009). *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: subtypes, diversity and persistence over time. *International journal of food microbiology*, 128(3), 516-520.
132. Lundén, J., Tolvanen, R., & Korkeala, H. (2004). Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *Journal of Dairy Science*, 87, E6-E12.
133. Lungu, B., O'Bryan, C. A., Muthaiyan, A., Milillo, S. R., Johnson, M. G., Crandall, P. G., & Ricke, S. C. (2011). *Listeria monocytogenes*: antibiotic resistance in food production. *Foodborne pathogens and disease*, 8(5), 569-578.

134. Maertens de Noordhout C., Devleeschauwer B., Angulo F. J., Verbeke G., Haagsma J., Kirk M., et al. (2014). The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.*;14: 1073–1082.
135. Malley, T. J., Butts, J., & Wiedmann, M. (2015). Seek and destroy process: *Listeria monocytogenes* process controls in the ready-to-eat meat and poultry industry. *Journal of Food Protection*, 78(2), 436-445.
136. 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(3), 287-293.
137. Manuale Merck (2001), quarta edizione, traduzione del Merck Manual of Diagnosis and Therapy – Seventeenth Edition, Beers M.H., Berkow R. editors, Medicom Italia, Milano.
138. Marriott, N. G., & Gravani, R. B. (2008). *Sanificazione nell'industria alimentare*. Springer Science & Business Media.
139. Martín, B., Perich, A., Gómez, D., Yangüela, J., Rodríguez, A., Garriga, M., & Aymerich, T. (2014). Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. *Food microbiology*, 44, 119-127.
140. Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Converti, A., Cotter, P. D., & de Souza Oliveira, R. P. (2013). Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnology advances*, 31(4), 482-488.
141. McAuliffe, O., Hill, C., & Ross, R. P. (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture. *Journal of Applied Microbiology*, 86(2), 251-256.
142. McLaughlin J., Martin W. (2008). Biology. In: Liu D., editor. Handbook of *Listeria monocytogenes*. Boca Raton (FL): CRC Press; p. 4.
143. McLaughlin, J. (1987). *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *Journal of applied bacteriology*, 63(1), 1-11.
144. McLaughlin, J. (1990). Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9(3), 210-213.
145. McLaughlin, J., Mitchell, R., Smerdon, W. J., & Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International journal of food microbiology*, 92(1), 15-33.
146. McLaughlan, A. M., & Foster, S. J. (1998). Molecular characterization of an autolytic amidase of *Listeria monocytogenes* EGD. *Microbiology*, 144(5), 1359-1367.
147. McLaughlin, H. P., Casey, P. G., Cotter, J., Gahan, C. G., & Hill, C. (2011). Factors affecting survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in soil samples. *Archives of Microbiology*, 193(11), 775-785.

148. Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., ... & Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases*, 5(5), 607.
149. Melo, J., Andrew, P. W., & Faleiro, M. L. (2015). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Research International*, 67, 75-90.
150. Merzoug, M., Dalache, F., Zadi Karam, H., & Karam, N. E. (2016). Isolation and preliminary characterisation of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GHB21 isolated from Algerian paste of dates “ghars”. *Annals of Microbiology*, 66(2), 795-805.
151. Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Battini, R., & Manicardi, G. (2001). Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1-2), 193-198.
152. Metlitskaya, A., Kazakov, T., Kommer, A., Pavlova, O., Praetorius-Ibba, M., Ibba, M., ... & Severinov, K. (2006). Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptide nucleotide antibiotic Microcin C. *Journal of Biological Chemistry*, 281(26), 18033-18042.
153. Mills, S., Stanton, C., Hill, C., & Ross, R. P. (2011). New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 299-329.
154. Mogensen, G., Salminen, S., O'brien, J., Ouwenhand, A., Holzapfel, W., Shortt, C., ... & Zink, R. (2002). Food microorganisms-health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods.
155. Mohammed, H. O., Stipetic, K., McDonough, P. L., Gonzalez, R. N., Nydam, D. V., & Atwill, E. R. (2009). Identification of potential on-farm sources of *Listeria monocytogenes* in herds of dairy cattle. *American journal of veterinary research*, 70(3), 383-388.
156. Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255.
157. Molenaar, D., Bringel, F., Schuren, F. H., de Vos, W. M., Siezen, R. J., & Kleerebezem, M. (2005). Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays. *Journal of Bacteriology*, 187(17), 6119-6127.
158. Montero, D., Boderó, M., Riveros, G., Lapierre, L., Gaggero, A., Vidal, R. M., & Vidal, M. (2015). Molecular epidemiology and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile. *Frontiers in microbiology*, 6, 384.
159. Montville, T. J., & Chen, Y. (1998). Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied microbiology and Biotechnology*, 50(5), 511-519.
160. Montville, T.J., Winkowski, K. (1997). Biologically-based preservation systems and probiotic bacteria. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (eds). *Food microbiology:*

fundamentals and frontiers. *American Society for Microbiology*. Press, Washington D.C., pp 557±577.

161. Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 4-2.
162. Muñoz, A., Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., Maqueda, M., & Valdivia, E. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: bactericidal synergism with heat. *International Dairy Journal*, 17(7), 760-769.
163. Murray P.R., Baron P., Faller RA, Manual of Clinical Microbiology, ASM press 6th edition, 341-347
164. Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, M.B.R. (1926). A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.Sp.). *J Pathol Bacteriol.* 29:407–439.
165. Navarro, L., Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Díez, L., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2008). Comparative study of the pln locus of the quorum-sensing regulated bacteriocin-producing *L. plantarum* J51 strain. *International journal of food microbiology*, 128(2), 390-394.
166. Ng, Z. J., Zarin, M. A., Lee, C. K., & Tan, J. S. (2020). Application of bacteriocins in food preservation and infectious disease treatment for humans and livestock: A review. *RSC Advances*, 10(64), 38937-38964.
167. Nightingale, K. (2010). *Listeria monocytogenes*: knowledge gained through DNA sequence-based subtyping, implications, and future considerations. *Journal of AOAC International*, 93(4), 1275-1286.
168. Nightingale, K. K., Schukken, Y. H., Nightingale, C. R., Fortes, E. D., Ho, A. J., Her, Z., ... & Wiedmann, M. (2004). Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Applied and environmental microbiology*, 70(8), 4458-4467.
169. Nishie, M., Nagao, J. I., & Sonomoto, K. (2012). Antibacterial peptides “bacteriocins”: an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol science*, 17(1), 1-16.
170. O'Sullivan, L., Ryan, M. P., Ross, R. P., & Hill, C. (2003). Generation of food-grade lactococcal starters which produce the lantibiotics lacticin 3147 and lacticin 481. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3681-3685.
171. OIE (2014). *Listeria monocytogenes*. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.9.7 p. 1–18. Available from: <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals>.
172. Olaimat, A. N., Al-Holy, M. A., Shahbaz, H. M., Al-Nabulsi, A. A., Abu Ghoush, M. H., Osaili, T. M., ... & Holley, R. A. (2018). Emergence of antibiotic resistance in *Listeria*

*monocytogenes* isolated from food products: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5), 1277-1292.

173. Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 50(3), 512-542.
174. Parente, E., Ciocia, F., Ricciardi, A., Zotta, T., Felis, G. E., & Torriani, S. (2010). Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: a multivariate screening study. *International journal of food microbiology*, 144(2), 270-279.
175. Parisi, A., Latorre, L., Fracalvieri, R., Miccolupo, A., Normanno, G., Caruso, M., & Santagada, G. (2013). Occurrence of *Listeria* spp. in dairy plants in Southern Italy and molecular subtyping of isolates using AFLP. *Food Control*, 29(1), 91-97.
176. Parks, W. M., Bottrill, A. R., Pierrat, O. A., Durrant, M. C., & Maxwell, A. (2007). The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. *Biochimie*, 89(4), 500-507.
177. Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial cell factories*, 13(1), 1-13.
178. Pettengill, J. B., Luo, Y., Davis, S., Chen, Y., Gonzalez-Escalona, N., Ottesen, A., ... & Strain, E. (2014). An evaluation of alternative methods for constructing phylogenies from whole genome sequence data: a case study with *Salmonella*. *PeerJ*, 2, e620.
179. Pintado, C. M. B. S., Oliveira, A., Pampulha, M. E., & Ferreira, M. A. S. S. (2005). Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiology*, 22(1), 79-85.
180. Pintado, C. M., Ferreira, M. A., & Sousa, I. (2009). Properties of whey protein-based films containing organic acids and nisin to control *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*, 72(9), 1891-1896.
181. Porto, M. C. W., Kuniyoshi, T. M., Azevedo, P. O. S., Vitolo, M., & Oliveira, R. S. (2017). *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances*, 35(3), 361-374.
182. Pradhan, A. K., Ivanek, R., Gröhn, Y. T., Geornaras, I., Sofos, J. N., & Wiedmann, M. (2009). Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in selected categories of deli meats: impact of lactate and diacetate on listeriosis cases and deaths. *Journal of food protection*, 72(5), 978-989.
183. Prencipe, V. A., Rizzi, V., Acciari, V., Iannetti, L., Giovannini, A., Serraino, A., ... & Caporale, V. (2012). *Listeria monocytogenes* prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain. *Food Control*, 25(1), 150-158.



184. Quatravaux, S., Remize, F., Bryckaert, E., Colavizza, D., & Guzzo, J. (2006). Examination of *Lactobacillus plantarum* lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters. *Journal of applied microbiology*, 101(4), 903-912.
185. Rahimi, E., Momtaz, H., Behzadnia, A., & Baghbadorani, Z. T. (2014). Incidence of *Listeria* species in bovine, ovine, caprine, camel and water buffalo milk using cultural method and the PCR assay. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(1), 50-53.
186. Ramu, R., Shirahatti, P. S., Devi, A. T., & Prasad, A. (2015). Bacteriocins and their applications in food preservation. *Critical reviews in food science and nutrition*, 0-0.
187. Rawool, D. B., Malik, S. V. S., Shakuntala, I., Sahare, A. M., & Barbuddhe, S. B. (2007). Detection of multiple virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases. *International Journal of Food Microbiology*, 113(2), 201-207.
188. Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa le procedure nel campo della sicurezza alimentare, in GUCE n. L 31 del 1° gennaio 2002
189. Regolamento (CE) N. 2073/2005. European Commission (2005) of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. In "Off J Eur Union", Vol. L 338, 1-29.
190. Regolamento (CE) N. 852/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 Sull'igiene dei prodotti alimentari.
191. Regolamento (UE) 2020/763 della Commissione del 9 Giugno 2020 che modifica l'allegato del Regolamento (UE) n. 231/2012 che stabilisce le specifiche degli additivi alimentari elencati negli allegati II e III del Regolamento (CE) n. 1333/2008. GU L 83 del 22.3.2012.
192. Regolamento CE 1331/2008 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008 che istituisce una procedura uniforme di autorizzazione per gli additivi, gli enzimi e gli aromi alimentari. GU L 354 del 31.12.2008
193. Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., & Penna, A. L. B. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124-140.
194. Ren, D., Li, C., Qin, Y., Yin, R., Du, S., Ye, F., ... & Jin, N. (2014). In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe*, 30, 1-10.
195. Renzoni, A., Cossart, P., & Dramsi, S. (1999). PrfA, the transcriptional activator of virulence genes, is upregulated during interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells and in eukaryotic cell extracts. *Molecular microbiology*, 34(3), 552-561.
196. Rocourt, J. (1996). "Risk factors for listeriosis." *Food Control* 7.4-5: 195-202.

197. Rogga, K. J., Samelis, J., Kakouri, A., Katsiari, M. C., Savvaïdis, I. N., & Kontominas, M. G. (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(1), 59-67.
198. Rojo-Bezares, B., Saenz, Y., Navarro, L., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2007). Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food Microbiology*, 24(5), 482-491.
199. Rudolf, M., & Scherer, S. (2001). High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International journal of food microbiology*, 63(1-2), 91-98.
200. Ryser, E. T., & Marth, E. H. (1999). Foodborne listeriosis. *Food Science And Technology-New York-Marcel Dekker-*, 299-358.
201. Ryser, E.T. (2011). Pathogens in Milk | *Listeria monocytogenes*. *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition), Pages 81-86.
202. Saeed A. E. A., Zubeir E.M., Owni O. A. O. (2009). Antimicrobial resistance of bacteria associated with raw milk contaminated by chemical preservatives. *World J Dairy Food Sci* 4(1):65–69.
203. Sauders, B. D., & Wiedmann, W. (2007). Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. In E. T. Ryser, & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety* (3rd ed., pp. 21e53). Boca Raton, FL: CRC Press.
204. Sauders, B.D. and Wiedmann, M. (2007). Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment, p 21–53. In Ryser ET and Marth EH (ed), *Listeria, listeriosis, and food safety*, 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
205. Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., ... & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging infectious diseases*, 17(1), 7.
206. Schillinger, U., Geisen, R., & Holzapfel, W. H. (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science & Technology*, 7(5), 158-164.
207. Schlech III, W. F., & Acheson, D. (2000). Foodborne listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*, 31(3), 770-775.
208. Schmid, M. W., Ng, E. Y., Lampidis, R., Emmerth, M., Walcher, M., Kreft, J., ... & Schleifer, K. H. (2005). Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(1), 1-18.
209. Schuchat A., Pinner R., Deaver K., Swaminathan B., Weaver R., Hayes P.S., Reeves M., Pierce P., Wenger J., Broome C. and the *Listeria* study group (1991). Epidemiology of listeriosis in the USA. In A.Amgar (ed) *Listeria and fod safety ASEPT, Laval, France*, 67-73.

210. Schuppler, M., & Loessner, M. J. (2010). The opportunistic pathogen *Listeria monocytogenes*: pathogenicity and interaction with the mucosal immune system. *International journal of inflammation*, 2010.
211. Selby, T. L., Berzins, A., Gerrard, D. E., Corvalan, C. M., Grant, A. L., & Linton, R. H. (2006). Microbial heat resistance of *Listeria monocytogenes* and the impact on ready-to-eat meat quality after post-package pasteurization. *Meat Science*, 74(3), 425-434.
212. Sergelidis, D., Abraham, A., Sarimvei, A., Panoulis, C., Karaioannoglou, P., & Genigeorgis, C. (1997). Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp. in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. *International Journal of Food Microbiology*, 34(2), 171-177.
213. Siezen, R. J., Tzeneva, V. A., Castioni, A., Wels, M., Phan, H. T., Rademaker, J. L., ... & van Hylekama Vlieg, J. E. (2010). Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. *Environmental microbiology*, 12(3), 758-773.
214. Silva, C. C., Silva, S. P., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in microbiology*, 9, 594.
215. Simha, B. V., Sood, S. K., Kumariya, R., & Garsa, A. K. (2012). Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. *Microbiological research*, 167(9), 544-549.
216. Skandamis, P. N., Gounadaki, A. S., Geornaras, I., & Sofos, J. N. (2012). Adaptive acid tolerance response of *Listeria monocytogenes* strains under planktonic and immobilized growth conditions. *International journal of food microbiology*, 159(2), 160-166.
217. Sleator, R. D., Watson, D., Hill, C., & Gahan, C. G. (2009). The interaction between *Listeria monocytogenes* and the host gastrointestinal tract. *Microbiology*, 155(8), 2463-2475.
218. Sobrino-López, A., & Martín-Belloso, O. (2008). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, 18(4), 329-343.
219. Song, D. F., Zhu, M. Y., & Gu, Q. (2014). Purification and characterization of plantaricin ZJ5, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5. *PLoS one*, 9(8), e105549.
220. Strawn, L. K., Gröhn, Y. T., Warchocki, S., Worobo, R. W., Bihn, E. A., & Wiedmann, M. (2013). Risk factors associated with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination of produce fields. *Applied and environmental microbiology*, 79(24), 7618-7627.
221. Su, X., Zhang, J., Shi, W., Yang, X., Li, Y., Pan, H., ... & Meng, J. (2016). Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from foods and humans. *Food Control*, 70, 96-102.
222. Suwanjinda, D., Eames, C., & Panbangred, W. (2007). Screening of lactic acid bacteria for bacteriocins by microbiological and PCR methods. *Biochemistry and molecular biology education*, 35(5), 364-369.

223. Swaminathan B. (2001). *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology: fundamentals and frontiers, 2nd edition*, edited by M.P.Doyle, ASM press, Washington, D.C. The Veterinary Journal, 153, 9-29.
224. Swaminathan, B., & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and infection*, 9(10), 1236-1243.
225. Thakur, M., Asrani, R. K., & Patial, V. (2018). *Listeria monocytogenes*: A food-borne pathogen. In *Foodborne diseases*(pp. 157-192). Academic Press.
226. Todorov, S. D., & Dicks, L. M. (2009). Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). *International Journal of Food Microbiology*, 132(2-3), 117-126.
227. Todorov, S. D., & Franco, B. D. G. D. M. (2010). *Lactobacillus plantarum*: Characterization of the species and application in food production. *Food Reviews International*, 26(3), 205-229.
228. Todorov, S. D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J. G., & Franco, B. D. (2011). Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*)—From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. *Food Research International*, 44(5), 1351-1363.
229. Todorov, S. D., van Reenen, C. A., & Dicks, L. M. T. (2004). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. *The Journal of general and applied microbiology*, 50(3), 149-157.
230. Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of food protection*, 65(4), 709-725.
231. UNI EN ISO 11290-1:2017, Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp.-Part1: Detection method.
232. UNI EN ISO 11290-2:2017, Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp.-Part 2: Enumeration method.
233. Uyttendaele, M., Busschaert, P., Valero, A., Geeraerd, A. H., Vermeulen, A., Jacxsens, L., ... & Devlieghere, F. (2009). Prevalence and challenge tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. *International journal of food microbiology*, 133(1-2), 94-104.
234. Välimaa, A. L., Tilsala-Timisjärvi, A., & Virtanen, E. (2015). Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain—a review. *Food Control*, 55, 103-114.
235. Van de Weyer, A., Devleeschouwer, M. J., & Dony, J. (1993). Bactericidal activity of disinfectants on *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(4), 480-483.

236. Van Heel, A. J., de Jong, A., Montalban-Lopez, M., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2013). BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-) bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic acids research*, *41*(W1), W448-W453.
237. 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. *Journal of Dairy Science*, *87*(9), 2822-2830.
238. Vasseur, C., Rigaud, N., Hébraud, M., & Labadie, J. (2001). Combined effects of NaCl, NaOH, and biocides (monolaurin or lauric acid) on inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* spp. *Journal of Food Protection*, *64*(9), 1442-1445.
239. Vázquez-Boland, J. A., Domínguez-Bernal, G., González-Zorn, B., Kreft, J., & Goebel, W. (2001). Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes and infection*, *3*(7), 571-584.
240. Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., ... & Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical microbiology reviews*, *14*(3), 584-640.
241. Vincent, P. A., & Morero, R. D. (2009). The structure and biological aspects of peptide antibiotic microcin J25. *Current medicinal chemistry*, *16*(5), 538.
242. Walsh, D., Duffy, G., Sheridan, J. J., Blair, I. S., & McDowell, D. A. (2001). Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. *Journal of Applied Microbiology*, *90*(4), 517-522.
243. Wang, C. Y., Lin, P. R., Ng, C. C., & Shyu, Y. T. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, *16*(6), 578-585.
244. Wang, D., Chen, Q., Huo, H., Bai, S., Cai, G., Lai, W., & Lin, J. (2017). Efficient separation and quantitative detection of *Listeria monocytogenes* based on screen-printed interdigitated electrode, urease and magnetic nanoparticles. *Food control*, *73*, 555-561.
245. Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., & den Bakker, H. C. (2015). *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *65*(Pt\_1), 286-292.
246. Welshimer, H. J. (1968). Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation. *Journal of Bacteriology*, *95*(2), 300-303.
247. Wen, J., Deng, X., Li, Z., Dudley, E. G., Anantheswaran, R. C., Knabel, S. J., & Zhang, W. (2011). Transcriptomic response of *Listeria monocytogenes* during the transition to the long-term-survival phase. *Applied and environmental microbiology*, *77*(17), 5966-5972.
248. WHO (2018), World Health Organization. Antibiotic resistance. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.

249. Wiedmann, M. (2002). Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC International*, 85(2), 524-532.
250. Wiedmann, M., Bruce, J. L., Knorr, R., Bodis, M., Cole, E. M., McDowell, C. I., ... & Batt, C. A. (1996). Ribotype diversity of *Listeria monocytogenes* strains associated with outbreaks of listeriosis in ruminants. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5), 1086-1090.
251. Wilson, A., Gray, J., Chandry, P. S., & Fox, E. M. (2018). Phenotypic and genotypic analysis of antimicrobial resistance among *Listeria monocytogenes* isolated from Australian food production chains. *Genes*, 9(2), 80.
252. Xie, Y., An, H., Hao, Y., Qin, Q., Huang, Y., Luo, Y., & Zhang, L. (2011). Characterization of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LB-B1 isolated from koumiss, a traditionally fermented dairy product from China. *Food Control*, 22(7), 1027-1031.
253. Yücel, N., Cıtaç, S., & Önder, M. (2005). Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. *Food microbiology*, 22(2-3), 241-245.
254. Zhu, K., Ding, X., Julotok, M., & Wilkinson, B. J. (2005). Exogenous isoleucine and fatty acid shortening ensure the high content of anteiso-C15: 0 fatty acid required for low-temperature growth of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8002-8007.

La borsa di dottorato è stata cofinanziata con risorse del  
 Programma Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CCI 2014IT16M2OP005),  
 Fondo Sociale Europeo, Azione I.1 "Dottorati Innovativi con caratterizzazione Industriale"



UNIONE EUROPEA  
 Fondo Sociale Europeo

