UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO: **Produzione, Qualità e Sicurezza alimentare (XXX CICLO)**

Prevenzione della Listeriosi: studio della contaminazione negli alimenti di origine animale e sorveglianza attiva in strutture sanitarie

Docente Guida
Dott. Christian Scarano

Il Coordinatore
Prof. Salvatore Naitana

Tesi di dottorato del
Dott. Daniele Casti

ANNO ACCADEMICO 2016 – 2017

Università degli Studi di Sassari

Corso di Dottorato di ricerca in

Scienze Veterinarie, curriculum “Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare”

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Scienze Veterinarie, curriculum “Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare”, dell’Università degli Studi di Sassari, a.a. 2014/2017 - XXX ciclo, con il sostegno di una borsa di studio cofinanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività l.3.1 “Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell’ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali”.

La tesi è stata prodotta, altresì, grazie al contributo della Fondazione di Sardegna.

Sommario

CAPITOLO 1 3

1. Introduzione 3

1.1 *Listeria* spp. 3

1.1.1 *Listeria* sensu strictu 4

1.1.2 *Listeria* sensu lato 6

1.2 ***Listeria monocytogenes*** 8

1.2.1 Fattori di virulenza e patogenicità 9

1.2.2 Antibiotico resistenza 14

1.2.2 Sistemi di identificazione fenotipica e genotipica 16

1.2.4 Studio di popolazione 22

1.3 Listeriosi 29

1.3.1 Patogenesi 30

1.3.2 Sintomatologia 32

1.3.3 Terapia 34

1.4 Sistemi di sorveglianza ed epidemiologia della listeriosi 35

CAPITOLO 2 41

2. Scopo del lavoro 41

CAPITOLO 3 44

2.1 Sviluppo ed applicazione di protocolli per la sorveglianza attiva della listeriosi umana. 44

2.2 Valutazione del livello di contaminazione da *Listeria monocytogenes* negli alimenti. 46

2.2.1 Valutazione del livello di contaminazione presso stabilimenti caseari. 48

2.2.2 Valutazione del livello di contaminazione da *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes* su RTE commerciali. 52

2.2.3 Valutazione della contaminazione la *Listeria monocytogenes* in alimenti somministrati presso strutture ospedaliere. 54

2.3 Costituzione di un network per l'attuazione di programmi di sorveglianza attiva. 58

CAPITOLO 4 61

2.4 *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat sandwiches collected from vending machines 61

CAPITOLO 5 70

2.5 Studio del potenziale invasivo di ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da alimenti pronti al consumo reperibili in commercio 70

CAPITOLO 6 78

6.0 Studio dei ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati 78

CAPITOLO 7 84

7.0 Conclusioni 84

Bibliografia 87

Prevenzione della Listeriosi: studio della contaminazione negli alimenti di origine animale e sorveglianza attiva in strutture sanitarie.

CAPITOLO 1

1. Introduzione

1.1 *Listeria* spp.

Il genere Listeria spp., è compreso nella famiglia delle Listeriaceae e nell'ordine Bacillales (con altre importanti famiglie di batteri in particolare quella delle Staphylococcaceae), che fa capo alla Classe III (Bacilli), ed al Phylum BXIII Firmicutes (Bergey, 2001).

Il genere *Listeria* è attualmente composto da 17 specie, (*Listeria monocytogenes, Listeria seeligeri, Listeria ivanovii, Listeria welshimeri, Listeria marthii, Listeria innocua, Listeria grayi, Listeria fleischmannii, Listeria floridensis, Listeria aquatica, Listeria newyorkensis, Listeria cornellensis, Listeria rocourtiae, Listeria weihenstephanensis, Listeria grandensis, Listeria riparia, e Listeria booriae*) 9 delle quali descritte a partire dal 2009 (Renato H. Orsi & Martin Wiedmann, 2016; Scallan *et al.* 2011). Si tratta di piccoli bacilli gram positivi, non sporulati, anaerobi facoltativi, catalasi positivi, ossidasi negativi e beta emolitici. *Listeria* spp. è mobile a 25°C ma non mobile a 37°C, in quanto il gene che codifica per i flagelli non viene trascritto a temperature elevate (Dons et al., 1992; Kathariou et al., 1995). *Listeria* spp. cresce a temperature comprese tra 0 e 45 °C

(Halter *et al.*, 2013). *Listeria spp* non scresce a temperature inferiori a -1.5 °C, ma può sopravvivere a temperature molto basse. Il range di temperature ottimale per la crescita è compreso tra 30-37 °C, le temperature intorno ai 50 °C risultano essere letali (Rocourt and Buchrieser, 2007).

Solamente 2 di queste specie, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii,* sono considerate patogene. L'individuazione di nuove specie di *Listeria,* pur non essendo patogene, è importante per rilevare le condizioni che consentono la presenza, la crescita e la persistenza delle specie patogene e sullo sviluppo per nuove tecniche di identificazione. Il genere *Listeria* viene diviso in 2 gruppi, *Listeria* sensu strictu, che include *L. monocytogenes, L. seeligeri, L. marthii, L. ivanovii, L. welshimeri, and L. innocua* (Chiara et al. 2015), e *Listeria* sensu lato che include le restanti 11 specie. La separazione di questi 2 gruppi è basata sulla correlazione delle specie a *L. monocytogenes*, che è la specie più importante in termini di impatto economico e salute pubblica.

1.1.1 *Listeria* sensu strictu

Il gruppo *Listeria* sensu strictu comprende *L. monocytogenes, L. seeligeri, L. ivanovii, L. welshimeri, e L. innocua* descritte prima del 1985 e *L. marthii* descritta nel 2010.

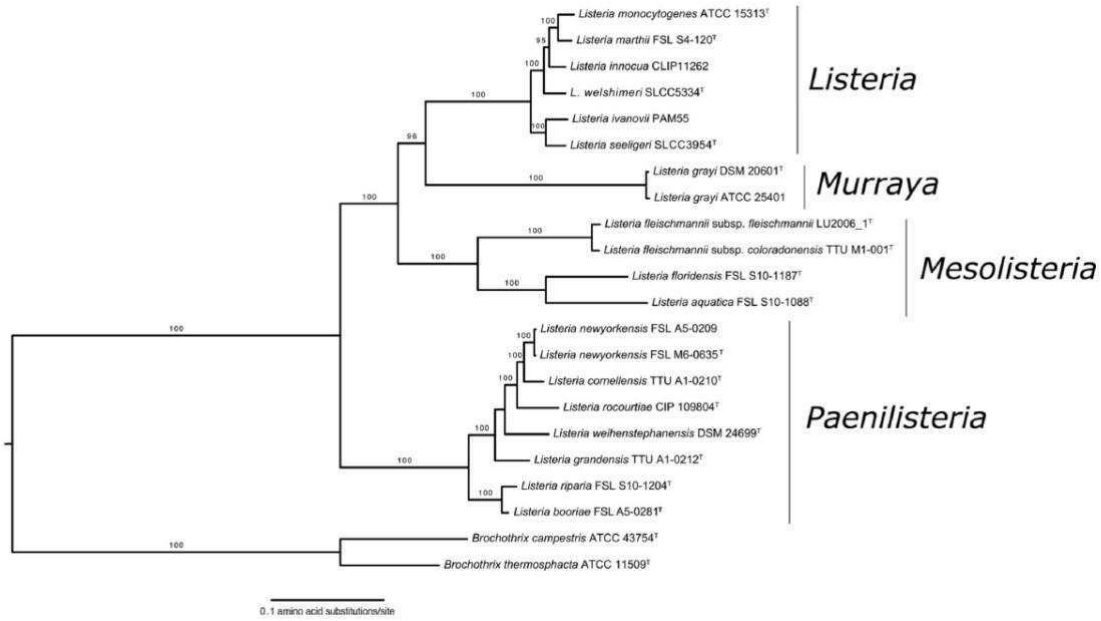

Figura 1 Albero filogenetico modificato da Weller et al. (2015).

Queste specie condividono la capacità di crescere a basse temperature (4°C), la motilità a 30°C, la reazione alla catalasi e al test Voges-Proskauer positiva, l'incapacità di ridurre il nitrato in nitrito e la capacità di produrre acetoina dalla fermentazione del glucosio. Inoltre, tutte le specie sensu stricto sono in grado di fermentare il D-arabitolo, α-metil D-glucoside, cellobiosio, D-fruttosio, D-mannosio, N-acetilglucosammina, maltosio e il lattosio, mentre nessuna delle specie è in grado di fermentare l'inositolo, L-arabinosi e il D-mannitolo (Bertsch et al., 2013; Bille Et al. 1992; Den Bakker et al. 2014; McLauchlin e Rees 2009; Weller et al. 2015).

Solamente 2 specie sono considerate patogene, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*. Quest'ultima può essere differenziata da tutte le altre specie del gruppo sensu stricto, in

quanto è l'unica in grado di fermentare il D-ribosio (Bertsch et al. 2013; Bille et al. 1992; den Bakker et al. 2014; McLauchlin and Rees 2009; Weller et al. 2015).

L. monocytogenes oltre ad essere in grado di causare malattia nell'uomo, è stata individuato come responsabile di malattia in oltre 40 specie animali. *L. ivanovii* è stato prevalentemente legato a patologie nella pecora, (Chand and Sadana 1999; Sergeant et al. 1991) occasionalmente nei bovini (Alexander et al. 1992; Gill et al. 1997) e raramente nell'uomo (Cummins et al. 1994; Guillet et al. 2010; Lessing et al. 1994; Ramage et al. 1999; Snapir et al. 2006).

1.1.2 *Listeria* sensu lato

Il gruppo *Listeria* sensu lato è composto da *L. grayi* (la prima specie descritta nel 1966), *L. fleischmannii, L. floridensis, L. aquatica, L. newyorkensis, L. cornellensis, L. rocourtiae, L. weihenstephanensis, L. grandensis, L. riparia*, e *L. booriae* (Weller et al. 2015). Le specie appartenenti a questo gruppo sono state isolate in prodotti vegetali, nel latte crudo e nelle acque (Renato H. Orsi & Martin Wiedmann, 2016), in Italia *L. newyorkensis* è stata isolata nel latte crudo (Chiara et al. 2015).

Come le specie appartenenti al gruppo *Listeria* sensu stricto, le specie appartenenti al gruppo *Listeria* sensu lato, sono catalasi positive, non sporulate, acapsulate. *L. grayi* e uno dei due ceppi di *L. aquatica*, sono in grado di produrre acetoina a partire dalla

fermentazione del glucosio (reazione positiva al test Voges-Proskauer), mentre tutte le altre specie del gruppo *Listeria* sensu lato, non hanno questa capacità (den Bakker et al. 2014). Studi sulla motilità eseguiti da Weller et al. (2015) hanno dimostrato che tutti i ceppi sensu lato testati, ad eccezione di *L. grayi*, non sono mobili a temperature comprese tra 4 e 37°C. Tali risultati sono stati confermati dagli studi genomici che segnalano l'assenza di geni flagellari in tutti i ceppi *Listeria* sensu lato ad eccezione di *L. grayi* (Chiara et al. 2015; den Bakker et al. 2013; den Bakker et al. 2014). *L. grayi* si differenzia dalle altre specie dello stesso gruppo per la capacità di fermentare il D-Mannitolo (McLauchlin & Rees 2009; Weller et al. 2015). *L. fleischmannii* non cresce a basse temperature e si differenzia dalle alte specie sensu lato per la capacità di fermentare il D-arabitolo, L-ramnosio, e il D-ribosio (Bertsch et al. 2013; den Bakker et al. 2013; Weller et al. 2015). *L. floridensis* non cresce a temperature inferiori a 7°C ed è l'unica specie a non ridurre il nitrato (den Bakker et al. 2013; Weller et al. 2015). In linea generale, nessuna delle specie del gruppo sensu lato risulta essere patogena, questa caratteristica è stata confermata anche dalla negatività ai test emolitici, al test sull'attività della fosfolipasi C e della fosfoinositide (Bertsch et al. 2013; den Bakker et al. 2013; den Bakker et al. 2014; Lang Halter et al. 2013; Leclercq et al. 2010; Weller et al. 2015). Inoltre, test su linee cellulari cancerogene umane (Caco-2), hanno dimostrato che *L.*

fleischmannii non è in grado di penetrare all'interno delle cellule epiteliali umane (Bertsch et al. 2013).

1.2 ***Listeria monocytogenes***

L. monocytogenes è un patogeno intracellulare facoltativo, in grado di causare la Listeriosi, una rara ma grave patologia umana che include tra i sintomi tipici, setticemia, aborto ed encefalite (McLauchlin and Rees 2009). È un batterio di forma bastoncellare con lunghezza compresa tra 0,5 e 2 μm e larghezza di 0,4-0,5 μm, catalasi positivo e ossidasi negativo (Farber J. M. et al.1991). Le colonie hanno un aspetto tondeggiante, sono traslucide e leggermente convesse, con una superficie finemente strutturata (Gray M. L. et al 1966), di colore giallo se coltivate su terreni arricchiti (Triptone Soy Agar, TSA) e azzurro-grigio su terreni specifici (LithiumChloride-Phenylethanolo-Moxalactam) (Murrai PR). È mobile, a temperature comprese tra 20 e 25°C, grazie alla presenza di un flagello peritrico. La motilità è inibita a temperature superiori a 35 °C (Fabbi et al., 2005). Il suo optimum di crescita è compreso tra 30 e 37°C e non è in grado di sviluppare e moltiplicarsi a temperature inferiori a 0°C o superiori ai 50°C (Fabbi et al., 2005). Fleming et al.,1985 sostengono che *L. monocytogenes* possegga una tolleranza termica superiore a quella degli altri patogeni non sporigeni presenti negli alimenti; è infatti in grado di sopravvivere a temperature di refrigerazione comprese tra 2° e 4°C

(Prencipe et al., 2012). Il valore di a_W ottimale per lo sviluppo *L. monocytogenes* nell'alimento è ≥ 0,97. Il microrganismo è, inoltre, un batterio alotollerante poiché capace di crescere con concentrazioni di NaCl pari al 12% (Fabbi et al., 2005); per questo la conservazione di alcuni alimenti in un ambiente saturo di sale non ha spesso alcun effetto inibitori sullo sviluppo del microrganismo. *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 discapito della sua replicazione. La persistenza del microrganismo negli ambienti di lavorazione per lungo tempo è favorita dalla sua capacità di aderire alle superfici, come l'acciaio inox e polistirolo, grazie alla produzione di biofilm che gli permette di sopravvivere ad alte concentrazioni di disinfettanti ed antibiotici (Valimaa et al 2015).

1.2.1 Fattori di virulenza e patogenicità

L. Monocytogenes è un patogeno intracellulare facoltativo in grado di moltiplicarsi in cellule fagocitarie e non (Cossart et al 2003; Farber et al 1991; Gaillard et al 1987; Vazquez-Boland et al 2001). I fattori di virulenza possono essere classificati in due categorie.

1. Fattori di virulenza implicati nell'adesione e l'invasione della cellula ospite

- ***InlA:*** interagisce con una proteina chiamata E-caderina presente sulla superficie delle cellule epiteliali intestinali dell'ospite attivando il processo di fagocitosi (Ciolacu et al. 2014).
- ***InlB:*** rappresenta una componente responsabile nel meccanismo di invasione cellulare mediante l'interazione con almeno tre recettori conosciuti come Met, gC1qR e glicosaminoglicani, è principalmente coinvolta nell'invasione degli epatociti (Fabbi et al., 2005) e dei fibroblasti.
- ***IAP (invasion associated protein)*** denominata anche p60, sembra sia coinvolta in particolare nel processo di invasione dei fibroblasti (Swaminathan, 2001), svolge un importante ruolo nel processo di moltiplicazione cellulare grazie all'attività idrolasica nei confronti della parete cellulare.
- ***Ami*****:** è una proteina di superficie che svolge un'attività litica nei confronti della parete cellulare di *L.monocytogenes*, con un importantissimo ruolo nel processo di adesione.
- ***FbpA*****:** modula i livelli di *Listeriolisina O* ed *InlB* prevenendo la degradazione dei principali fattori di virulenza.
- ***Listeriolisin O (LLO)*****:** insieme alle due fosfolipasi *PlcA*o *PlcB* è implicata nella distruzione del fagosoma mediante la formazione di pori nella

membrana, comportando degli squilibri ionici e la successiva liberazione del batterio nel citoplasma. È implicata nei meccanismi di adesione cellulare, nel processo di apoptosi delle cellule dendritiche, e mediante la produzione di Interleukina–1 è in grado di interferire nei meccanismi di reazione immunitaria (Swaminathan, 2001).

2. Fattori di virulenza coinvolti nel ciclo intracellulare.

   - ***Fosfolipasi A e B*:** rappresentate dalle subunità A e B sono responsabili della distruzione del vacuolo litico. La fosfolipasi A è responsabile della lisi della membrana del fagolisosoma primario, mentre la fosfolipasi B contribuisce alla lisi del vacuolo a doppia membrana che si forma durante il processo di invasione cellulare (Cossartet al. 2008).

- ***ActA*:** coinvolta nel processo di adesione cellulare ed ingresso all'interno delle cellule ospite polimerizzando i 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 l'ambiente extracellulare e quindi l'esposizione agli anticorpi.

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

- ***Fosfolipasi C*:** specifica di *L.monocytogenes* e alcuni ceppi *di L.ivanovii* è responsabile della liverazione del batterio nel citoplasma della cellula ospite grazie all'azione litica nei confronti della membrana vacuolo fagocitario o della doppia membrana formatasi durante la diffusione da cellula a cellula (Vazquez-Boland et al., 2001a).
- ***Mpl*:** è una proteina zinco-dipendente che contribuisce all'attivazione ed alla maturazione delle fosfolipasi e della cisteina della cellula ospite.

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 può essere influenzata da diversi fattori ambientali, come la temperatura (optimum 37°C) e la presenza di condizioni stressanti (Swaminathan, 2001) (Sokolovic et al., 1990). L'elevata concentrazione di ferro e temperature al di sotto dei 20°C si comportano, invece, da fattori inattivanti (Goebel et al., 2000; Kreft et al., 2001).

La maggior parte delle infezioni umane sono causate da *L. monocytogenes* ma anche *L. ivanovii* e *L. seelingeri* possono colpire sia gli uomini che gli animali (Hof & Hefner, 1988; Seeliger et al 1984).

All'interno della specie *L. monocytogenes* è possibile distinguere 4 differenti sierogruppi indicati come 1/2, 3, 4 e 7. Tale classificazione si basa sulla presenza di 14 antigeni somatici (O) stabili al calore, identificati da un numero da I a XIV e 5 flagellari H (A,B,C,D, E) sensibili al calore (Fabbi et al., 2005). Tali sierogruppi sono suddivisi a loro volta in 13 sierotipi: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e ed infine 7. Sebbene tutti possano potenzialmente causare malattia, il 95% degli isolati umani appartiene a 4 sierotipi: 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b (Nakamura et al., 2004; Gasanov et al., 2005). Il sierotipo 4b è quello che più comunemente è stato associato ai casi epidemici di listeriosi umana (Dussurget, 2008) anche se recentemente la proporzione di focolai associati a ceppi di sierotipo 1/2a è in costante aumento (Gianfranceschi et al., 2009; Allerberger e Wagner, 2010).

I sierotipi 1/2a e 1/2b sono responsabili di casi sporadici di infezione (Ryser, 2003) anche se recentemente la proporzione di focolai associati a ceppi di sierotipo 1/2a è in costante aumento (Gianfranceschi et al., 2009; Allerberger e Wagner, 2010).

La maggiore virulenza di questi sierotipi è correlata ad alcune caratteristiche come la maggior resistenza alle batteriocine a 4°C e la maggior tolleranza al pH gastrico durante il passaggio nel tubo digerente (Rocourt, 1996; Fabbi et al., 2005). Il sierotipo 4b riesce a sopravvivere meglio al trattamento termico e si replica molto più rapidamente dopo la refrigerazione a 37°C, rispetto al sierotipo 1/2a. Queste caratteristiche giustificano la maggiore capacità dei sierotipi 4b di essere patogeni per l'uomo (Fabbi et al., 2005).

1.2.2 Antibiotico resistenza

Il *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (CA-SFM) (CA-SFM, 2010) e il *National Reference Center for Listeria* (NRCL) hanno riportato che *L. monocytogenes* responsabile di infezioni umane mostra una naturale resistenza ai fluorochinoloni di prima generazione e alle cefalosporine, specialmente di terza e quarta

generazione, fosfomicina, oxacillina, lincosamidi, (Gòmez D. et al., 2014) tetracicline, minocicline e streptomicine (Charpentier E. & Courvalin P. 1999; Georgnaras I. & Holy A.V., 2001; Srinivasan V. et al., 2005).

La capacità di *L. monocytogenes* a resistere agli antibiotici è dovuta ad una resistenza naturale o acquisita (AMR) del batterio.

I geni *tet*, *tet*(M) *tet* (S), *aad*, *cat*, *erm*, *dfrD* offrono una resistenza naturale del microrganismo a tetracicline, streptomicina, cloramfenicolo, macrolidi e trimetoprim (Gray M.C. et al., 2006). La mutazione dei geni *gyrA* e *parC* e la sovra espressione del gene *lde* sono responsabili della resistenza ai fluorochinoloni (Graves L.M. et al., 2007; Lismond A. et al., 2008).

La resistenza acquisita è dovuta alla capacità di sviluppare materiale genetico esogeno contenente geni di antibiotico resistenza (Kovacevic J. Et al., 2013; Conter M. et al., 2009). Il plasmide PI501, che conferisce resistenza a cloramfenicolo, macrolidi, lincosamidi e streptogrammine, è stato il primo ad essere identificato come trasferibile tra le varie specie di *Listeria*. È stato inoltre ipotizzato che *L. innocua* possa costituire una sorta di reservoir per i geni di resistenza che poi sono acquisiti da *L. monocytogenes*

(Bertrand S. et al., 2005). Conoscere il pattern di sensibilità tra *L. monocytogenes* e *L. innocua* è importante in virtù del fatto che spesso entrambe le specie si trovano negli stessi cibi o negli stessi ambienti di lavorazione dei cibi (Gòmez D. et al., 2012).

L'utilizzo errato, il mancato rispetto dei tempi di esposizione, delle concentrazioni dei prodotti, la mancata variabilità nell'impiego dei disinfettanti nell'industria alimentare, può favorire una selezione microbica all'interno degli ambienti di lavorazione con uno sviluppo delle resistenze acquisite da parte del microrganismo, infatti l'uso frequente di composti dell'ammonio quaternario nelle industrie alimentari, può favorire la selezione di ceppi antibiotico-resistenti, determinando la sopravvivenza di *L. monocytogenes* negli ambienti di produzione (Kovacevic J. Et al., 2013).

1.2.2 Sistemi di identificazione fenotipica e genotipica

Il Reg. CE 2073/2005 prevede 2 metodi di ricerca, quantitativo (determinazione della presenza del microrganismo) EN/ISO 11290-2 e qualitativo (conteggio del microrganismo) EN/ISO 11290-1. Entrambi prevedono l'impiego di Agar *Listeria* acc. to Ottaviani & Agosti (ALOA) che è un terreno selettivo, cromogenico e differenziale per la determinazione ed il conteggio di *Listeria monocytogenes* negli alimenti ed in altri campioni. La maggior parte dei metodi di coltura consiste in cinque fasi: 1) Pre-

arricchimento; 2) l'arricchimento selettivo; 3) semina su terreni differenziali / selettivi; 4) test biochimici; 5) test sierologici. Metodi di rilevamento coinvolgono arricchimento selettivo in brodo, seguita dall'isolamento di colonie in agar selettivo. L'azione selettiva dell'AOLA è dovuta alla presenza nel terreno di base del litio cloruro ed all'aggiunta della miscela antimicrobica del supplemento selettivo contenente ceftazidime, polimixina B, acido nalidissico e cicloeximide. L'azione differenziale è dovuta alla presenza nel terreno del composto cromogenico X-glucoside quale substrato per l'evidenziazione dell'enzima ß-glucosidasi, comune a tutte le specie di Listeria. L'azione differenziale specifica è ottenuta con un substrato specifico per la fosfolipasi C (PIPLC), propria della sola specie *L. monocytogenes* e di alcuni ceppi di *L.ivanovii*. Con l'azione combinata dei due substrati è possibile differenziare le seguenti colonie: *L. monocytogenes*: colonie verde-blu circondate da un alone opaco. *Listeria* spp. colonie verde-blu senza alone opaco. Lequerq 2004 riporta che ALOA è risultato il terreno migliore tra i quattro esaminati e che la sua introduzione nei metodi d'analisi in sostituzione di Oxford e PALCAM aumenta l'isolamento ed il conteggio dei ceppi atipici di *L. monocytogenes*. ALOA mostra una percentuale di recupero superiore dei ceppi virulenti, ipovirulenti ed avirulenti di *L. monocytogenes* rispetto al terreno PALCAM e ad altro terreno cromogeno (Gracieux et al., 2003). In una sperimentazione su 132 campioni di alimenti, ALOA ed un secondo terreno cromogeno consentono di determinare *L. monocytogenes* in tempi più

rapidi e con maggiore sensibilità e specificità rispetto al terreno PALCAM (Sacchetti et al., 2003).

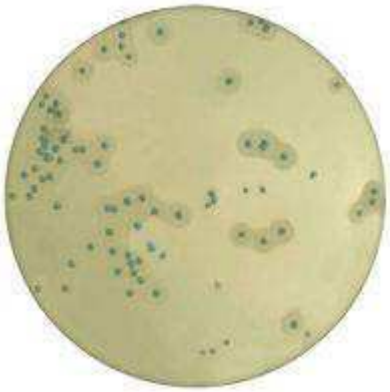

Figura 2: Aspetto delle colonie di Listeria con e senza alone di precipitazione su terreno selettivo ALOA. (http://www.biomerieux-industry.com)

Successivamente all'isolamento mediante metodiche colturali, si eseguono ulteriori test di conferma come il test della catalasi, della colorazione di gram, della prova dell'emolisi e del camp test. Inoltre è possibile ricorrere all'impiego di metodi biochimico metabolici che utilizzano reagenti chimici in grado di determinare un viraggio cromatico della sospensione batteria preparata. il preparato viene posto ad incubare a temperatura controllata per 24-48 ore, successivamente si procede alla lettura manuale o automatica che sfrutta le varie combinazioni di colore per determinare la specie batterica sottoposta ad analisi.

Ulteriori metodi di ricerca, sono rappresentati dall'amplificazione del DNA mediante PCR, l'immunolocalizzazione e la Real Time PCR che permettono il rilievo del

microrganismo in tempi più brevi (< 48h), a seguito dell'eliminazione di alcune fasi dei metodi convenzionali quali, ad esempio, la selezione di colonie tipiche su terreni di coltura selettivi (Mata et al. 2016). La Real Time PCR permette di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale in quanto misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR. Questa metodica permette di effettuare indagini qualitative e quantitative. L'indagine qualitativa permette di determinare esclusivamente la presenza di una determinata sequenza, mentre l'indagine quantitativa attraverso l'utilizzo di fluorocromi che ad ogni ciclo di reazione emettono una fluorescenza proporzionale alla quantità di amplificato, consente di determinare e quantificare la presenza del DNA target.

Sono disponibili anche test immunoenzimatici che permette la ricerca qualitativa di *L. monocytogenes* con il metodo ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). Queste metodiche permettono di determinare la presenza/assenza del microrganismo sugli alimenti e sugli ambienti di lavorazione grazie all'utilizzo di coni in cui sono fissati gli anticorpi anti-*L. monocytogenes*. Il protocollo operativo prevede l'allestimento di un brodo di arricchimento selettivo che viene distribuito in una cartuccia contenente i coni. Gli antigeni presenti si legano agli anticorpi anti-*L. monocytogenes* fissati sulle pareti interne del cono, mentre gli elementi non legati vengono eliminati tramite lavaggio. Successivamente, gli anticorpi coniugati con la biotina vengono aspirati/rilasciati dal

cono e si fissano agli antigeni di *L. monocytogenes*, a loro volta legati agli anticorpi adesi alla parete del cono.

La presenza di biotina viene rilevata grazie all'incubazione con la streptavidina accoppiata alla fosfatasi alcalina. Ulteriori fasi di lavaggio eliminano il coniugato non fissato. Nella fase finale di rivelazione il substrato, 4-Metilumbelliferil fosfato, viene aspirato/rilasciato dal cono; l'enzima del coniugato ne catalizza l'idrolisi in un prodotto fluorescente (4-Metil-umbelliferone). L'intensità della fluorescenza emessa è misurata a 450 nm.

I sistemi di tipizzazione molecolare, rappresentano un grosso contributo nelle analisi di eventi epidemici, come lo studio dei focolai nella popolazione, e nello studio della pianificazione di programmi di controllo, sorveglianza e prevenzione della listeriosi (Jadhav S. et al., 2012).

Per la caratterizzazione di *L. monocytogenes* vengono impiegati:

- metodi di ricerca fenotipici come ad esempio la sierotipizzazione e il *multilocus enzyme electrophoresis MLEE*.
- tecniche molecolari basate su PCR e/o restrizione enzimatica (es. *multiplex-PCR*, *repetitive element PCR, Random Amplified Polymorphic DNA, ribotyping*, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis PFGE*, *Amplified Fragment Length Polymorphism*)

- tecniche di analisi di sequenza (es. *Multilocus Sequence Typing MLST*, *Single Nucleotide Polymorphism typing* e *Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis*).

Tra i metodi fenotipici più largamente utilizzati per la differenziazione degli isolati della stessa specie batterica rientra la sierotipizzazione, una tecnica classica che sfrutta il differente corredo degli antigeni di superficie degli isolati che può essere rilevato grazie ad antisieri (Wiedmann M. 2012). Questa tecnica ha lo svantaggio di avere un basso potere discriminante, ma ha come vantaggio quello di essere economica, di conseguenza viene impiegata prevalentemente per uno screening immediato e rapido dei ceppi isolati in casi di focolai sospetti, selezionando i campioni da sottoporre ad analisi più sensibili ma più indaginose e costose (Graves L. M. et al., 2007).

Un'ulteriore tecnica di genotipizzazione, basata su *multiplex-PCR*, è stata messa a punto per semplificare tale identificazione. Essa distingue i ceppi in 4 sierogruppi associati ai sierotipi: Gruppo 1 (sierotipi 1/2a e 3a), Gruppo 2 (1/2c e 3c), Gruppo 3 (1/2b, 3b e 7) e Gruppo 4 (4b, 4d e 4e) (Pini P. N. et al., 1988). Un limite della metodica è rappresentato dal fatto che non distingue i sierotipi 1/2a da 3a, 1/2c da 3c, 1/2b da 3b e 7, o 4b da 4d e 4e, né separa 4a e 4c dalle altre specie di Listeria *spp*. tuttavia tale svantaggio rappresenta un compromesso accettabile dal punto di vista epidemiologico, in quanto i sierotipi 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4e, 4d e 7 sono estremamente rari (Huang B. et al., 2011).

Tra le tecniche di tipizzazione fenotipica la MLEE, *Multilocus enzyme electrophoresis* permette di differenziare ceppi di *L. monocytogenes* sfruttando la mobilità elettroforetica di enzimi costitutivi, ciascuno dei quali è presente in questa specie batterica in diverse varianti. È una tecnica di difficile standardizzazione, poco riproducibile e laboriosa ma viene impiegata in quanto economica (Jadhav S. et al., 2012).

Sebbene i metodi di tipizzazione convenzionali abbiano ancora una certa utilità, nel tempo sono stati sempre più sostituiti dalle tecniche di tipizzazione genetica, come ad esempio la PFGE, che ad oggi è il metodo d'elezione per la tipizzazione di *L. monocytogenes*. Questa tecnica si basa sull'estrazione dell'intero genoma batterico e sulla sua restrizione in 8-25 frammenti di elevato peso molecolare. Tali frammenti di DNA cromosomico vengono sottoposti a elettroforesi in campo pulsato. I profili di restrizione così ottenuti presentano un numero limitato di bande risultando di facile lettura e interpretazione e vengono classificati in diversi pulsotipi (Jadhav S. et al., 2012; Dongyou L. 2005)

1.2.4 Studio di popolazione

Come definito dal *Codex ALimentarius*, un efficiente sistema di gestione della sicurezza degli alimenti, prevede l'adozione di prerequisiti generali (prerequisiti strutturali, buone prassi igieniche GHP, e corrette prassi di lavorazione GMP) e procedure operative basate

sul sistema HACCP. La presenza di microrganismi alteranti e patogeni sugli alimenti dovuti a contaminazioni ambientali, è un pericolo sempre presente anche se vengono implementate strette misure igieniche (ICMSF, 2002). Le contaminazioni post-processo, rappresentano un potenziale pericolo soprattutto per gli alimenti pronti al consumo (RTE) che non sono sottoposti a cottura o altro tipo di trattamento in grado di eliminare o ridurre ad un livello accettabile il microrganismo d'interesse, prima del loro consumo (Reg. CE 2073/2005). I microrganismi che si possono trovare negli ambienti di lavorazione possono essere classificati in 2 gruppi, transienti e residenti. I microrganismi transienti, vengono eliminati con l'applicazione delle procedure di pulizia e disinfezione e la loro presenza è indice di una reintroduzione nello stabilimento. I microrganismi residenti invece, sono quei microrganismi che non sono totalmente eliminati dalle ordinarie procedure di pulizia e disinfezione, permanendo negli ambienti di lavorazione. *L. monocytogenes* grazie alla capacità di formare biofilm e nicchie negli ambienti di lavorazione, è protetto dall'azione dei sanificanti, creando le condizioni favorevoli per la sopravvivenza e la crescita (Chmielewski & Frank, 2003). Le nicchie originano nei siti difficilmente raggiungibili con l'applicazione delle ordinarie procedure di pulizia e sanificazione, come pavimenti o pareti con fessurazioni, guarnizioni usurate, canalette di scolo delle acque, siti difficilmente accessibili di apparecchiature speciali. La loro

formazione è condizionata da condizioni favorevoli di umidità, presenza di nutrienti, temperatura, Ph e sale.

Secondo Muhterem-Uyar *et al*., 2015, la contaminazione ambientale può essere classificata in:

- contaminazione sporadica, se associata a scarsa applicazione delle GHP e GMP;
- Hotspot, se la contaminazione persiste nel tempo in siti critici (nicchie);
- Contaminazione diffusa, se è dovuta a gravi mancanze strutturali e nell'applicazione delle procedure igieniche.

Un programma di monitoraggio ambientale, se ben progettato, rappresenta uno strumento fondamentale per prevenire la contaminazione degli alimenti (Tompkin, 2002). Il Reg. CE 2073/2005, prevede che gli operatori del settore alimentare (OSA) che producono alimenti pronti al consumo, ready-to-eat (RTE), i quali possono sviluppare *L. monocytogenes*, devono procedere al prelievo di campioni nelle aree di lavorazione e dalle attrezzature per la ricerca del microrganismo, indica la Norma ISO 18593 come metodo di riferimento per la conduzione del campionamento ma non fornisce ulteriori elementi da adottare per la conduzione del programma di monitoraggio ambientale. Il regolamento definisce invece tra i criteri di sicurezza alimentare, elementi più specifici riguardo i prodotti sui quali effettuare la ricerca del microrganismo, come, il piano di campionamento, i limiti critici, il metodo di analisi di riferimento e la fase a cui si applica

il criterio. Stabilisce inoltre che gli alimenti non permissivi allo sviluppo di *L. monocytogenes* devono avere pH ≤ 4,4 o aw ≤ 0,92, oppure pH ≤ 5,0 e aw ≤ 0,94. Anche i prodotti con un periodo di conservabilità inferiore a 5 giorni, sono considerati appartenenti automaticamente appartenenti a questa categoria.

Per quanto riguarda informazioni più specifiche sulla conduzione dei campionamenti ambientali, a livello internazionale sono stati pubblicati una serie di documenti e linee guida rivolte agli OSA e alle autorità di controllo (Harris & Blackwell, 1999; HPA, 2009; CFIA, 2011: MPI, 2012; K GMA, 2014; PHE, 2014).

L'International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2002) ha definito il concetto di zona di rischio e secondo questo principio è possibile dividere i siti di campionamento con un livello di rischio decrescente:

- Zona 1: siti ad alto rischio, superfici a diretto contatto con l'alimento, come utensili, piani di lavoro, attrezzature, guanti, coltelli ecc.);
- Zona 2: siti adiacenti a quelli direttamente a contatto con gli alimenti, superfici esterne di apparecchiature, carrelli, grembiuli);
- Zona 3: siti all'interno dalle aree di lavorazione ma lontani dal prodotto, quindi potrebbero fungere da fonte di contaminazione, ad esempio pavimenti e pareti;
- Zona 4: siti che stanno fuori dagli ambienti di lavorazione e quindi a più basso rischio come i magazzini, uffici, spogliatoi, bagni).

Il campionamento ambientale può essere effettuato prima dell'inizio delle attività produttive o comunque dopo le operazioni di pulizia e disinfezione (monitoraggio pre-operativo) (FDA, 2008; NSW, 2008) o durante le fasi di lavorazione o al termine delle stesse (monitoraggio operativo) (Tompkin, 2002). Nel monitoraggio pre-operativo è importante considerare il fatto che se effettuato subito dopo le operazioni di pulizia e disinfezione, i residui di sanificanti possono causare danni sub-letali ai microrganismi rendendole non colturabili seppur vitali. In tali circostanze il campionamento ambientale è più efficace se eseguito dopo qualche ora (2-3) dal termine delle procedure di pulizia e sanificazione. La procedura dettagliata per la raccolta di campioni ambientali è stata descritta da APHA, 2001, e FSIS, 2014. A seconda del tipo di superficie da campionare, dalla forma e dalla facilità di accesso, possono essere impiegati tamponi, spugnette, garze o piastre da contatto (Evancho *et al*., 2001). Nel caso di campionamento operativo, il tampone o la spugna sterile, sono inumiditi con *Buffered Peptone Water* (BPW) un brodo non selettivo, mentre in caso di campionamento pre-operativo viene utilizzato un *Neutralizing Buffered Peptone Water* (nBPW) con lo scopo di recuperare i batteri che hanno subito un danno sub-letale. La superficie identificata come sito di campionamento deve essere sfregata accuratamente e la spugna o il tampone devono essere riposti in una busta sterile. Esistono vari kit in commercio costituiti da una spugna/tampone preinumiditi, guanti sterile e busta sterile richiudibile per il trasporto. Se si vuole

effettuare un'indagine qualitativa e quindi esprimere la presenza/assenza del microrganismo, non è necessario delimitare una superficie esatta, nel caso invece si volesse esprimere un risultato in termini di carica microbica per cm^2, è necessario delimitare un'area ben definita, ad esempio 100 cm^2 attraverso l'uso di mascherine (ISO, 2004; CFIA, 2011).

Non esistono livelli soglia di contaminazione assoluti, ma ciascuno stabilimento deve individuare un target specifico, tenendo conto del tipo di attività, degli alimenti che produce, del layout dello stabilimento, del tipo di area e sito che sta andando a campionare. Conte superiori al proprio livello target sono indicazione precoce di potenziali falle nelle GHP, GMP e nelle procedure di pulizia e disinfezione. Per quanto riguarda *L. monocytogenes*, è sufficiente determinare la presenza/assenza del microrganismo e attraverso un programma di monitoraggio ambientale è possibile mappare i siti di contaminazione, questo permette di individuare le possibili fonti di contaminazione, la presenza di nicchie di persistenza e individuare le opportune azioni correttive. Non è da sottovalutare la presenza di *Listeria* spp. negli ambienti di lavorazione, anche se accompagnata da assenza di *L. monocytogenes.* Questa condizione indica che nonostante il microrganismo patogeno sia assente, sono presenti tutte le condizioni ambientali e igienico sanitarie affinché possa svilupparsi. È molto importante distinguere se la presenza di *L. monocytogenes* è legata alla persistenza del

microrganismo negli ambienti o è dovuta ad una sua reintroduzione. Questo è possibile attraverso la caratterizzazione dei ceppi con l'ausilio di tecniche molecolari come la RANDOM *Amplified Polymorphic* DNA (RAPD), *Amplified Fragment Lenght Polymorphism* (AFLP), *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), DNA microarrays e il sequenziamento genico. La PFGE rappresenta il Gold Standard utilizzato nel corso di indagini epidemiologiche condotte a seguito di episodi epidemici di listeriosi. Se i risultati delle analisi confermano che il ceppo si rinviene in un sito in occasioni ripetute nel tempo, indicano che il ceppo è diventato residente. Se invece si trovano ceppi ogni volta differenti, significa che siamo di fronte a nuove introduzioni. La caratterizzazione dei ceppi è utile anche per tracciarne gli spostamenti all'interno dello stabilimento in maniera tale da poter individuare i punti deboli del sistema di gestione igienica. La presenza del medesimo ceppo su più linee di lavorazione, è indice di una cross-contaminazione tra le linee. La caratterizzazione dei ceppi permette di condurre studi di popolazione del microrganismo, al fine di stabilire la variabilità dei ceppi che circolano all'interno del medesimo stabilimento.

1.3 Listeriosi

La causa della listeriosi è riconducibile quasi esclusivamente a l'ingestione di alimenti contaminati dal microrganismo (Scallan et al. 2011). Gli alimenti principalmente coinvolti sono la carne (salsicce, patè, prosciutti, salami, pollo) verdure preconfezionate, prodotti della pesca come cozze, pesce affumicato, molluschi crudi, latte crudo, gelati e formaggi freschi. La capacità del microrganismo di sopravvivere e moltiplicarsi in condizioni tipicamente sfavorevoli come, pH elevato, elevata concentrazione salina e temperature comprese tra -2 e -42°C, rappresenta un serio problema per l'industria alimentare (Wang H. L. et al., 2013; Bajard S. et al., 1996).

La listeriosi può colpire, oltre all'uomo, anche altri mammiferi (ad esempio ruminanti) e uccelli (Schuchat et al. 1991). Nell'uomo, la patologia può colpire raramente individui sani, ma nella stragrande maggioranza dei casi colpisce individui giovani, anziani e immunocompromessi.

Il periodo di incubazione della listeriosi è molto variabile e fin dai primi lavori pubblicati (Linnan M. J. et al., 1988) è stato definito in un intervallo di tempo variabile tra i 3 e 70 giorni. Nei casi associati alla gravidanza gli autori hanno definito un periodo di incubazione che varia da 17 a 67 giorni, nei casi in cui viene coinvolto il sistema nervoso centrale invece si accorcia a 1-14 giorni, mentre quando associata a sintomatologia

gastrointestinale il periodo di incubazione medio è di 24 ore (da 6 ore a 10 giorni) (Cossart P. 2001; Swaminathan B. & Gerner-Smidt P. 2007).

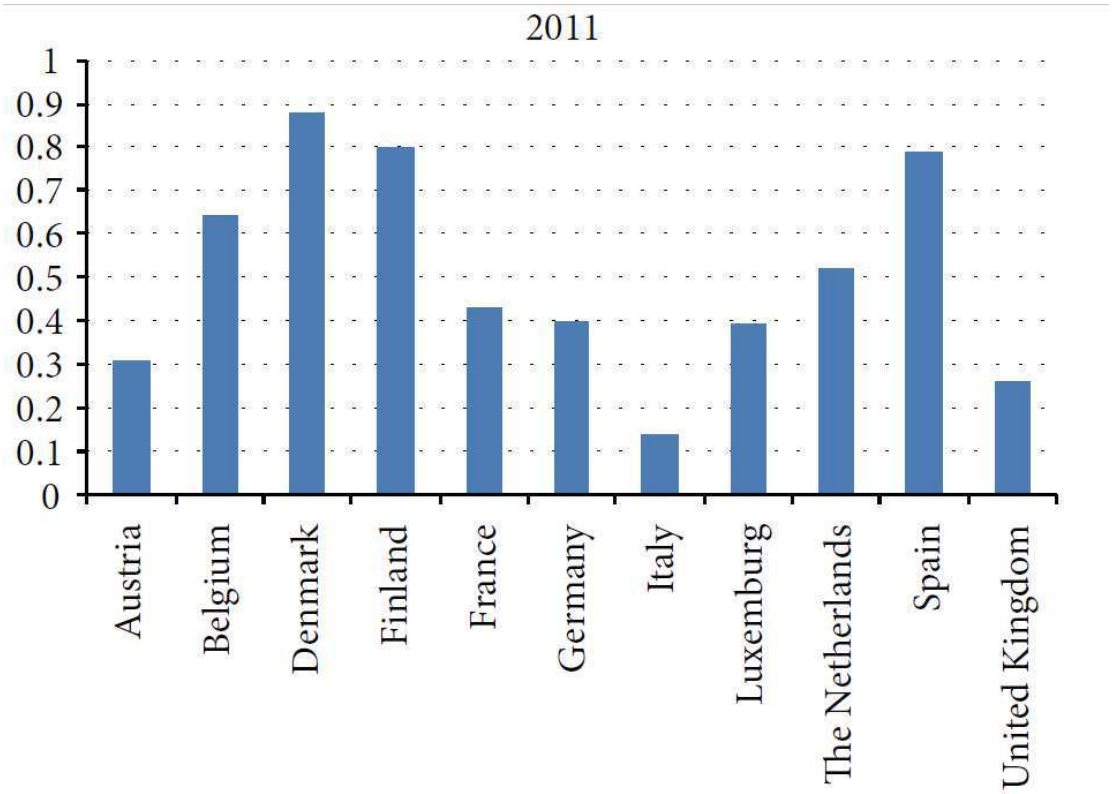

Figura 3. Numero di casi di *L. Monocytogenes* per 100.000 abitanti in Europa nel 2011, modificato da (Hernandez-Milian et al. 2014)

1.3.1 Patogenesi

L. monocytogenes sembra avere un potenziale patogeno più basso rispetto ad altri agenti eziologici di malattia alimentare. Ciò è confermato dalla DL50 relativamente alta per determinare infezione sperimentale sia per os (109 $\log_{10}$ ufc/gr), sia per via parenterale (da 105 a 106 $\log_{10}$ ufc/mL) su topi da laboratorio (Okamoto et al., 1994). La dose infettante per *L. monocytogenes* può variare dalle 100-1.000 ufc/gr o mL di alimento a

oltre 100 milioni di ufc/gr o mL, in base alla patogenicità, alla virulenza del ceppo in causa e ai fattori predisponenti dell'ospite (Vazquez-Boland et al., 2001).

Nelle persone appartenenti alle categorie a rischio come neonati, anziani, immunocompromessi e donne in gravidanza, identificati con l'acronimo YOPI (*Young, Old, Pregnant e Immunocompromised*), la dose infettante può essere notevolmente inferiore. La virulenza dei vari ceppi, non è univoca ma è correlata alla presenza di specifici fattori di virulenza (McLauchlin et al., 2004; Roche et al., 2009). La patogenicità di *L. monocytogenes* si esprime con la sua capacità di penetrare all'interno delle cellule dell'ospite, superando le difese della barriera intestinale e quelle anticorpali dell'organismo (Almudena Hernandez et al., 2014).

La virulenza del microrganismo è quindi connessa alla sua capacità di sintetizzare tutti quegli enzimi che permettono di lisare la membrana vescicolare del fagosoma in cui il batterio è inizialmente intrappolato e di produrre i filamenti di actina indispensabili per il passaggio dalla cellula invasa a quella adiacente, attuando così il "ciclo" di invasione cellulare (Ramaswamy et al., 2007) che avviene senza mai esporsi all'ambiente extracellulare, quindi nascondendosi al sistema immunitario dell'ospite.

L'infezione intestinale può progredire anche in altri organi e tessuti. Il fegato è solitamente il primo organo coinvolto, e se l'infezione non è controllata, come avviene nei soggetti immunodepressi, attraverso una batteriemia secondaria, vengono coinvolti i

linfonodi. A questo punto *L. monocytogenes* associata ai leucociti può invadere e superare le barriere emato-encefalica e placentare causando meningoencefaliti e aborti (forma invasiva). Le difese immunitarie da parte dell'ospite nei confronti della patologia, sono dovute principalmente all'azione dei linfociti-T. È chiaro che i pazienti immunodepressi e gli anziani risultano particolarmente vulnerabili nei confronti della patologia. Esiste un aumentato rischio di listeriosi invasiva in pazienti sottoposti a trattamenti chemioterapici e corticosteroidei, pazienti in emodialisi, trapiantati e diabetici, pazienti affetti da HIV, tossicodipendenti, donne in gravidanza e neonati.

1.3.2 Sintomatologia

Come suggerito da A. Juliàn et al., 2001, nei soggetti sani l'infezione da *L. monocytogenes* può essere asintomatica o provocare una sindrome gastrointestinale, associata a diarrea, nausea, vomito e febbre (forma non invasiva). Le forme invasive sono caratterizzate da batteriemia, e a causa del tropismo batterico per il sistema nervoso centrale da meningite e aborti. Sono stati segnalati come sintomi meno frequenti la mialgia e l'emicrania (De Valk H., 2005; Goulet V., 1996). La mortalità varia dal 20 al 30% a seconda degli autori (A. Julìan et al., 2001). A causa dell'elevata mortalità, la listeriosi è, dopo la salmonellosi, la seconda causa di morte correlata ad infezioni alimentari in Europa e USA (MMWR, 2009).

I sintomi sono riconducibili a nausea, diarrea, vomito nei casi non invasivi, mentre nelle forme invasive si manifestano setticemie e meningoencefaliti che possono portare alla morte. Nelle donne in gravidanza può portare ad aborti, natimortalità e morte fetale (Vàzquez-Boland et al. 2001). Negli USA vengono segnalate ogni anno circa 1460 ospedalizzazioni che causano morte in circa il 18% dei casi (Scallan et al. 2011). Nei paesi sviluppati, l'incidenza della listeriosi varia da 0,36 a 5 casi all'anno per milione di abitanti (EFSA 2011; Farber et al. 2011; Scallan et al. 2011). Nei paesi in cui il sistema di notifica della patologia non è efficiente, il numero dei casi segnalati potrebbe essere inferiore rispetto al numero dei casi reali. Sebbene molti autori suggeriscano che la maggior parte dei casi di listeriosi umana avvenga in forma sporadica, le nuove tecniche di identificazione molecolare, hanno permesso di identificare un elevato numero di focolai che assumevano una forma epidemica in paesi come gli Stati Uniti (CDC 2012; Gottlieb et al. 2012), Europa e Australia. *L. monocytogenes* è stata isolata da un'ampia varietà di alimenti come il latte e prodotti lattiero caseari, carne, uova, prodotti della pesca, vegetali, e alimenti pronti al consumo (ready-to-eat RTE) (Farber et al. 1991). Inoltre è stata isolata anche nel suolo, nella vegetazione, nelle acque reflue e in feci umane e animali (Fenlon, D. R. 1999; Olier M. et al. 2002). La presenza pressoché ubiquitaria del microrganismo e la capacità di adattarsi a condizioni ambientali stressanti, rappresentano dei fattori che contribuiscono a rendere difficile il controllo del

microrganismo, infatti *L. monocytogenes* viene frequentemente isolata in campioni ambientali ottenuti sia da negozi di vendita al dettaglio (Sauders et al. 2004; Sauders et al. 2009), ma anche nelle case dei consumatori (Beumer et al. 1996; Cox et al. 1989). Gioca un ruolo molto importante nella listeriosi, la contaminazione post processo ma precedente al confezionamento dell'alimento con il passaggio del microrganismo dagli ambienti di lavorazione al prodotto. Negli Stati Uniti oltre il 50% dei casi di listeriosi umana è stata associata al consumo di salumi contaminati durante la vendita al dettaglio (Endrikat et al. 2010; Pradhan et al. 2010).

1.3.3 Terapia

La listeriosi richiede una terapia antimicrobica e nei casi in cui si manifesta la batteriemia, è molto importante iniziare il trattamento con tempestività per evitare un esito fatale. Il farmaco d'elezione impiegato è un beta-lattamico, solitamente ampicillina. Nei pazienti oltre i 50 anni di età l'ampicillina viene associata ad un aminoglicoside, solitamente gentamicina (Lorber B. et al., 2010; Temple M. E. & Nahata M. C., 2000) ad un dosaggio di almeno 6 grammi nelle forme invasive (Temple M. E. & Nahata M. C., 2000). In caso di pazienti allergici ai beta-lattamici, possono essere impiegati in alternativa trimetroprim/sulfametaziolo, eritromocina, vancomicina e fluorochinoloni (Lorber B. et al., 2010). La durata del trattamento in caso di batteriemia è di circa 2 settimane, ed è

variabile a seconda dell'andamento clinico della malattia. Tuttavia non esiste un protocollo che definisca una durata del trattamento. In caso di pazienti immunocompromessi, trattamenti di 2 settimane non sono stati sufficienti, con la comparsa di ricadute. Per questo è opportuno valutare di caso in caso l'opportuna durata del trattamento attraverso un monitoraggio dell'evoluzione clinica della patologia.

1.4 Sistemi di sorveglianza ed epidemiologia della listeriosi

La salute e la tutela dei consumatori, la correttezza degli scambi internazionali nel settore alimentare, sono temi che iniziano ad essere gestiti a livello globale a partire dal 1963 ad opera della FAO e dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) attraverso l'istituzione della *Codex Alimentarius Commission*. Fanno parte della commissione tutte le figure che operano nel settore alimentare come le autorità di controllo degli alimenti, esperti scientifici e tecnici alimentari, rappresentanti di associazioni dei consumatori, dei produttori, dell'industria e del commercio. Queste figure hanno istituito un documento, il *Codex Alimentarius* che rappresenta un programma creato per sviluppare standard e linee guida orientate a proteggere la salute dei consumatori. L'Unione Europea nel 2000 ha predisposto il Libro Bianco per la Sicurezza Alimentare e col Reg. CE 178/2002 getta le basi per l'istituzione della normativa che disciplina la gestione della sicurezza alimentare in ambito europeo, il cosiddetto "Pacchetto Igiene" stabilendo i principi e i requisiti

generali della legislazione alimentare, istituendo l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) e le procedure nel campo della sicurezza alimentare. L'EFSA può essere considerato come il consulente specialistico della Commissione Europea, consentendo al Parlamento Europeo e agli stati membri dell'UE di prendere decisioni in materia della gestione del rischio, rappresentando così il punto di riferimento in caso di nuove emergenze alimentari. L'EFSA esprime pareri scientifici, elabora dei report riguardanti le patologie dal consumo di alimenti e assume anche un ruolo di comunicazione dei rischi rivolte al consumatore. A livello europeo, dal 2005, è presente anche *l'European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) che è un'agenzia indipendente dell'UE con lo scopo di rafforzare le difese dei Paesi Membri nei confronti delle malattie infettive.

La creazione di un network di sorveglianza europeo è un importante strumento di prevenzione per la gestione del tasso di incidenza della listeriosi. L'obiettivo principale è quello di organizzare una raccolta di dati epidemiologici e degli stipiti di *L. monocytogenes,* studiandone le caratteristiche sierologiche e molecolari isolati da campioni clinici, da campioni alimentari e ambientali. In questo modo è possibile valutare il grado di correlazione filogenetica tra i tipi di *L. monocytogenes* tipizzati con quelli isolati da altri paesi stimando l'incidenza, i trend epidemiologici e le distribuzioni spazio-temporali della malattia.

In Italia, in base al D.M. 15/12/1990 la listeriosi invasiva è una malattia soggetta a notifica obbligatoria. Nonostante la bassa incidenza rispetto ad altre infezione trasmesse con gli alimenti (0,1 casi/100.000 abitanti), la listeriosi ha un forte impatto sanitario data la sua alta percentuale di mortalità (20-30%) e di ospedalizzazione (>90%) associate alla gravità della sintomatologia.

Il sistema di sorveglianza prevede che i laboratori inviino all'Istituto Superiore di Sanità (ISS) entro un mese dall'isolamento del microrganismo, i ceppi di *L. monocytogenes* accompagnati dalla scheda di notifica. L'ISS dopo aver eseguito i test di conferma biochimica e la tipizzazione sierologica e molecolare, invia annualmente i dati epidemiologici e microbiologici al Ministero della Salute che li invia all'ECDC.

Nel report riguardante le infezioni da *Listeria* spp. nei paesi della UE (EFSA & ECDC; 2016) viene segnalato che la listeriosi ha colpito circa 2.200 persone nel 2015, causando 270 morti, il numero più alto mai registrato nella UE. Tale incremento, non è necessariamente correlato all'aumento di nuovi focolai, ma potrebbe essere dovuto alla maggiore efficienza del sistema di notifica della malattia. Inoltre le abitudini alimentari e lo stile di vita dei consumatori, si stanno orientando in maniera crescente sul consumo di alimenti RTE. Sono stati confermati 1.524 casi di listeriosi e nel 64% sono state coinvolte persone di età superiore ai 65 anni. Nel 20% dei casi segnalati sugli over 65, la patologia

ha avuto esito letale. Nel 2015, la Germania è il paese in cui sono stati segnalati più casi confermati, 580 in totale, seguita dalla Francia 412 e Spagna 206.

In Italia, dal 2011 al 2015 i casi di listeriosi segnalati sono aumentati da 129 (0,22/100.000 abitanti) a 153 (0,25/100.000 abitanti). Nel 73,3% dei casi sono coinvolti adulti dell'età superiore a 65 anni (http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx).

Nel grafico seguente è possibile notare che il numero dei casi di listeriosi segnalati nell'UE e nell'Area Economica Europea (EEA) dal 2008 al 2015 (Report EFSA 2016) è aumentato progressivamente. Si possono notare nel corso del singolo anno dei picchi nella stagione estiva e una diminuzione progressiva nella stagione invernale. Tale andamento si ripete tutti gli anni e potrebbe essere legato al fatto che con l'aumentare delle temperature nei mesi estivi, è più difficile il mantenimento della catena del freddo durante il trasporto dei prodotti alimentari.

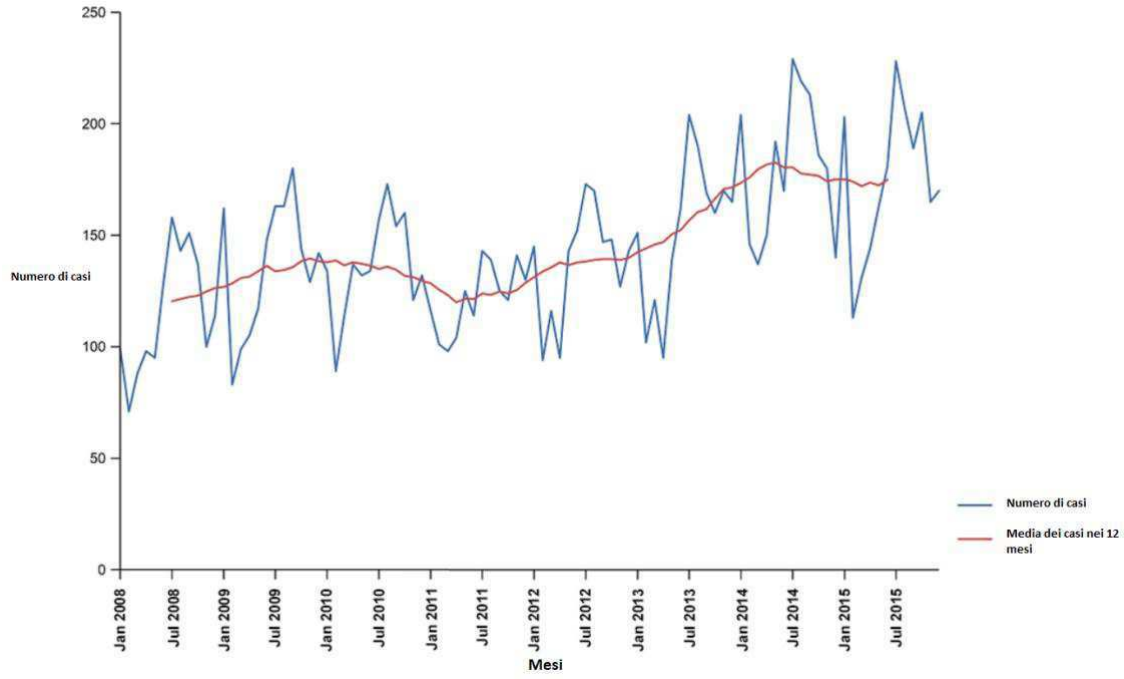

Figura 4. Numero di casi di Listeriosi umana in EU/EEA dal 2008-2015. Modificato da (EFSA & ECDC, 2016)

Nel grafico seguente vengono riportati i dati del ministero della Salute, per l'Italia, l'ultimo aggiornamento disponibile è relativo al 2013, mentre per le singole Regioni risale al 2009. In Sardegna fino al 2009 sono stati segnalati 3 casi, nel 1996, nel 2003 e nel 2006.

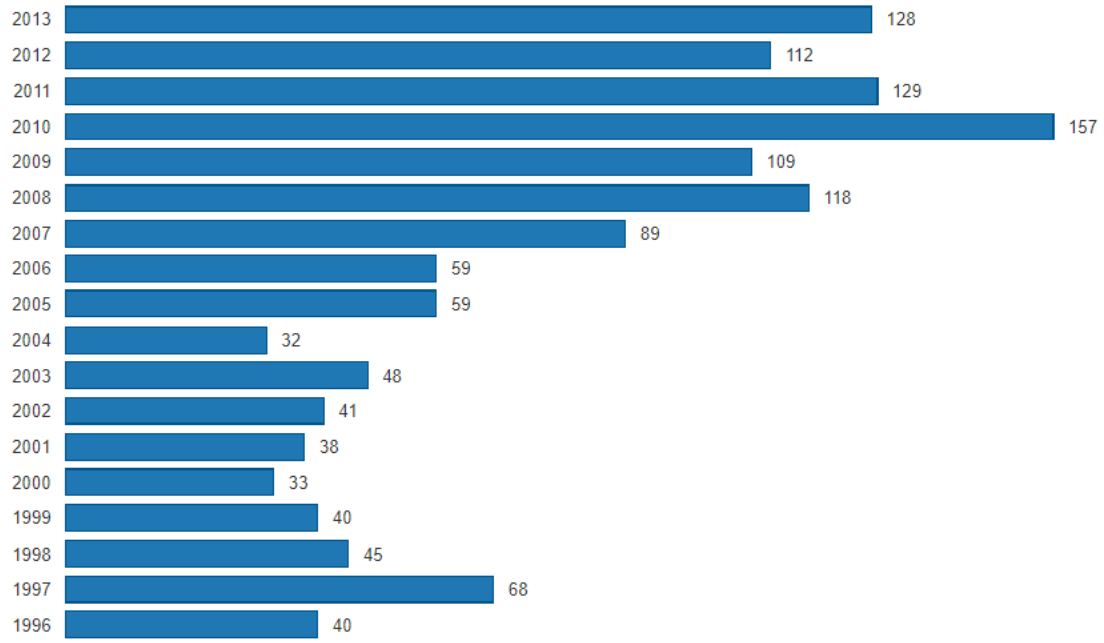

Figura 5. Casi di Listeriosi in Italia dal 1996 al 2013. http://www.epicentro.iss.it/problemi/listeria/epid1.asp.

CAPITOLO 2

2. Scopo del lavoro

Listeria monocytogenes è causa di una malattia batterica prevalentemente di origine alimentare chiamata listeriosi. A differenza di altre patologie alimentari, oltre alla forma gastrointestinale, può evolvere in una forma invasiva causando meningite, aborti, setticemia e morte. Spesso è difficile risalire all'alimento incriminato in quanto il patogeno presenta un lungo periodo di incubazione, che può andare oltre i 30 giorni. I prodotti alimentari coinvolti in Europa negli ultimi anni erano rappresentati da alimenti a base di latte, di carne e tra questi quelli maggiormente coinvolti erano gli RTE, quindi gli alimenti che non prevedono un trattamento letale per il microrganismo prima del consumo. I dati epidemiologici evidenziano come i casi di Listeriosi umana siano frequentemente associati ad alimenti con livello medio di contaminazione compreso fra 10^2-10^6 UFC /ml o /g. La listeriosi ha assunto una notevole importanza a partire dagli anni '80, dopo alcuni episodi di malattia a carattere epidemico e nonostante l'incidenza sia molto bassa (2-7 casi per milione di abitanti) presenta un elevato tasso di letalità (20-30%) e di ospedalizzazione (>90%). Nell'evoluzione della malattia, è di fondamentale importanza l'immunocompetenza dell'ospite, infatti sono maggiormente interessate le cosiddette categorie a rischio, identificate con l'acronimo YOPI, neonati, anziani, donne in gravidanza e persone immunocompromesse. L'obiettivo del presente lavoro è quello

di sviluppare un protocollo di sorveglianza attiva ospedaliera allo scopo di rendere più efficiente il monitoraggio epidemiologico dei casi clinici di listeriosi umana, in relazione alla possibile origine alimentare e definire le principali caratteristiche fenotipiche e genotipiche di ceppi di origine umana o alimentare circolanti nel Nord Sardegna. Le attività hanno compreso la definizione del profilo immunitario dei soggetti con sintomatologia clinica, acquisizione di ceppi di origine alimentare tramite campionamenti su alimenti pronti RTE refrigerati e uno screening in alcuni ambienti di lavoro come mense ospedaliere, laboratori di somministrazione pasti convenzionati con strutture ospedaliere, caseifici ovini ed industrie alimentari. L'analisi filogenetica degli isolati di *Listeria monocytogenes* dall'uomo, dalle matrici alimentari e dall'ambiente verrà condotta con lo scopo di stimare la circolazione dei ceppi prevalenti, responsabili di forme cliniche.

Le attività descritte nei capitoli 3,4, 5 e 6 sono state effettuate in ambito del progetto di ricerca "*Strategie di sorveglianza attiva e networking per il controllo delle infezioni da Listeria monocytogenes*" legge Regionale 7 Agosto 2007, n. 7.

Il lavoro riportato nel capitolo 4 è stato pubblicato su: Italian Journal of Food Safety 2016; volume 5:5500, pagine 61-64.

Il lavoro riportato nel capitolo 5 è stato pubblicato negli abstract book al XXVI Convegno Nazionale dell'Associazione Italiana a Veterinari Igienisti dal titolo "*La gestione della*

sicurezza alimentare e i controlli ufficiali: nuovi approcci e tendenze in ambito nazionale e comunitario". 2016, P021, pagina 27.

CAPITOLO 3

2.1 Sviluppo ed applicazione di protocolli per la sorveglianza attiva della listeriosi umana.

L'obiettivo era quello di migliorare l'efficienza del sistema di monitoraggio epidemiologico della listeriosi mediante l'implementazione delle procedure in atto che attualmente prevedono la ricerca di *Listeria monocytogenes* nel liquido cerebro spinale (CSF) esclusivamente in pazienti con manifestazioni cliniche riferibili a meningite e meningo-encefalite. L'implementazione ha previsto l'estensione della ricerca di *Listeria monocytogenes* nei pazienti con sintomatologia gastro-intestinale o ospedalizzati e la caratterizzazione del profilo immunitario in soggetti malati o portatori. Nei soggetti con sintomatologia gastro-intestinale riferibile a listeriosi, è stato previsto, precedentemente all'applicazione del protocollo terapeutico, il prelievo di feci ed in caso di isolamento di *Listeria monocytogenes*, il prelievo ematico. Sulle feci è stato effettuato la ricerca del patogeno mediante metodiche colturali, i ceppi isolati sono stati conservati per gli studi di caratterizzazione molecolare. Sui campioni di sangue, è stato effettuato lo studio di caratterizzazione di popolazioni linfocitarie e la definizione del profilo immunologico in soggetti affetti da listeriosi o in caso di isolamento di *Listeria monocytogenes*.

In fase preliminare, è stato predisposto un protocollo di sorveglianza attiva per il per il controllo delle infezioni da *Listeria monocytogenes* attraverso l'utilizzo di una scheda per

la raccolta dei dati anamnestici ed epidemiologici dei pazienti. La scheda conteneva informazioni riguardanti:

- Dati anagrafici del paziente
- Dati riguardanti il ricovero
- Fattori di rischio
- Sintomatologia in atto
- Analisi effettuate / da effettuare
- Abitudini alimentari
- Profilo immunologico

Sono stati analizzati 125 campioni di liquor cefalorachidiano (CSF) e sangue, prelevati da pazienti con sospetta malattia invasiva da *Listeria monocytogenes*. Dei 125 campioni analizzati, 6 sono risultati positivi per *Listeria monocytogenes*. Tutti i campioni sono stati analizzati mediante metodiche fenotipiche e biomolecolari.

2.2 Valutazione del livello di contaminazione da *Listeria monocytogenes* negli alimenti.

Gli obiettivi principali di questa attività erano quelli di valutare il livello di esposizione umana a *Listeria spp* e *Listeria monocytogenes* in seguito al consumo di alimenti, di isolare i ceppi di origine alimentare e valutare le relazioni di clonalità rispetto ai ceppi di origine umana ed effettuare un successivo studio di popolazione. Le attività di campionamento sono state effettuate presso strutture ospedaliere (mense interne, laboratori di somministrazione pasti convenzionati e distributori automatici di prodotti ready-to-eat) e in alimenti a più elevato rischio di contaminazione commercializzati in Sardegna, come prodotti ready-to-eat lattiero caseari e altri prodotti di origine animale o vegetale che per caratteristiche fisico-chimiche, shelf-life e tecnologia di produzione sono stati individuati a rischio per la presenza di *Listeria monocytogenes*.

In questa fase è stato valutato il possibile livello di esposizione dei consumatori in seguito al consumo di alimenti potenzialmente contaminati da *Listeria spp* e *Listeria monocytogenes*. Sono state analizzate diverse tipologie di alimenti a rischio e alcune superfici a contatto e non a contatto con l'alimento. Su tutti i campioni, la determinazione di *Listeria spp* e *Listeria monocytogenes*, è stata eseguita attraverso le metodiche previste dal Reg. CE 2073/2005 sui criteri microbiologici, rispettivamente UNI EN ISO 11290-01:2005 (ricerca qualitativa) e UNI EN ISO 11290-02:2005 (ricerca quantitativa).

2.2.1 Valutazione del livello di contaminazione presso stabilimenti caseari.

Sono stati predisposti alcuni campionamenti su due piccole stabilimenti alimentari del comparto caseario, settore di maggior impatto nel contesto produttivo della Regione Sardegna. Queste realtà produttive hanno manifestato interesse agli obiettivi del progetto di ricerca certificato da specifica lettera di intenti in allegato al progetto presentato. Per garantire una maggiore rappresentatività del contesto produttivo coinvolto, sono state inserite nelle attività progettuali, una realtà produttiva rappresentativa dell'industria e una rappresentativa delle cooperative. Presso i due caseifici partner della ricerca, sono stati eseguiti campionamenti ambientali con l'obiettivo di definire la prevalenza di *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes* negli ambienti del caseificio e individuare quali superfici o attrezzature rappresentino il maggiore veicolo di contaminazione. Sono state ulteriormente eseguite analisi su campioni di prodotti alimentari, quali ricotte salate a base di siero ovino e formaggi duri a lunga maturazione sempre a base di latte ovino. I campioni di superfici a contatto e non a contatto con l'alimento sono stati prelevati da siti scelti in base al concetto di rischio, scegliendo cioè i punti in cui il rischio di contaminazione è più alto. In accordo con l'approccio proposto dall'International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), nei due stabilimenti si è proceduto al raggruppamento dei siti di campionamento in 3 differenti zone. Zona 1 (rischio maggiore) comprende le superfici a diretto contatto con l'alimento (tavoli di

lavoro, carrelli e scaffali). Zona 2 (rischio medio) comprende superfici non a contatto ma strettamente adiacenti alla zona 1 (superfici adiacenti i macchinari). Zona 3 comprende tutte le superfici non a contatto (pavimenti, pareti e canalette di drenaggio).

Campioni ambientali: I prelievi per il rilievo del livello di contaminazione ambientale da *Listeria monocytogenes* sono stati condotti presso 1 caseificio industriale e una cooperativa. I campioni ambientali sono stati prelevati da diverse aree di lavorazione degli stabilimenti (ricevimento latte, lavorazione formaggio, lavorazione ricotta, salatura, stufatura, lavaggio ecc) e l'identificazione dei siti di campionamento è stata condotta considerando il concetto di zona di rischio. In ciascun'area sono state individuate superfici a contatto diretto col prodotto (tavoli, carrelli, scafali, stampi, etc.) e superfici non a contatto diretto (superfici esterne di attrezzature, pareti, pavimenti, canalette di drenaggio, ecc.). L'elenco delle aree campionate e dei siti raggruppati per zona di rischio è riportato in tabella 1. I campioni sono stati prelevati dall'ambiente di lavorazione durante il ciclo produttivo (almeno dopo 2-3 ore dal suo inizio) o al termine dello stesso poiché maggiormente rappresentativo della situazione microbiologica ambientale durante il processo. Sono stati prelevati complessivamente un totale di 62 campioni ambientali, di cui 37 presso il caseificio A (industriale) e 28 presso il caseifici B (cooperativa).

Campioni di prodotto: Presso ciascun caseificio sono prelevati, compatibilmente con le disponibilità, 3 campioni di ricotta salata non trattata termicamente. Le ricotte salate sono

state scelte tra i lotti di produzione meno recenti e che non siano stati sottoposti ad un trattamento termico. Sono inoltre stati eseguiti 3 campioni dalla crosta di formaggi duri di varia tipologia mediante l'utilizzo di sponge. Ciascun campione era rappresentativo della crosta di un pool di 5 forme diverse. Complessivamente sono stati prelevati 12 campioni, di cui 3 di ricotta salata del caseificio A, 3 poll di formaggi duri del caseificio A e 3 campioni di ricotta salata del caseificio B, 3 poll di formaggi duri del caseificio B. Tutti i campionamenti sono stati effettuati mediante l'utilizzo del kit commerciale (3M, St. Paul, Minnesota, USA) contenente una sponge sterile preinumidita con 10 ml di Buffer Peptone Water, guanti sterili e sacchetto sterile per il trasporto della sponge a temperatura di 4 ± 2 °C presso i laboratori del Settore di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari.

Su ciascun campione ambientale è stata effettuata la ricerca qualitativa di *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes* (UNI EN ISO 11290-01:2005). Sui campioni di prodotto è stata condotta anche la ricerca quantitativa (UNI EN ISO 11290-02:2005). I campioni positivi sono stati sottoposti a test di conferma fenotipici (reazione alla catalasi, reazione all'ossidasi e colorazione di Gram). In seguito alle conferme fenotipiche sui campioni positivi è stata eseguita la Polymerase Chain Reaction (PCR) per discriminare la presenza di *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes*.

Zona di Rischio	Area stabilimento	Superficie
1	Ricevimento latte, caseificazione formaggi duri, caseificazione formaggi freschi, stufatura, celle, lavaggio formaggi, stagionatura, confezionamento	Filtro latte, stampi, nastro trasportatore, carrelli, scaffali, tavoli, macchina lava formaggi.
2	Lavorazione ricotta	Carrelli drenaggio, tavoli, scaffali e ripiani.
3	Ricevimento latte, caseificazione formaggi duri, caseificazione formaggi freschi, stufatura, celle, lavaggio formaggi, stagionatura, confezionamento	Pavimenti e canalette di scolo

I risultati sono di seguito elencati:

Campioni ambientali: Complessivamente nella zona di rischio 1 sono state riscontrate positività a *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes* con una prevalenza dell'1%. Nella zona di rischio 2 non sono mai state riscontrate positività, mentre nella zona di rischio 3 sono state riscontrate positività a *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes* con una prevalenza del 4,29%.

Nello specifico per quanto riguarda il caseificio A tra i siti della zona di rischio 1 sono state riscontrate positività a *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes* con una prevalenza del 0,33 %, relativamente alle superfici dell'area di lavaggio dei formaggi e delle ricotte salate. Tra i siti della zona 2 non è stata riscontrata alcuna positività. Tra i siti della zona 3 sono state riscontrate positività a *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes* con una prevalenza dell'1,38%, interessando superfici delle aree di lavaggio dei formaggi e delle ricotte, della stagionatura e del confezionamento.

Nel caseificio B, tra i siti della zona 1 sono state riscontrate positività *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes* con una prevalenza dello 0,18 % anche in questo caso relativamente alle superfici dell'area di lavaggio dei formaggi e delle ricotte salate. Tra i siti della zona 2 non è stata riscontrata alcuna positività. Tra i siti della zona 3 sono state riscontrate positività a *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes* con una prevalenza dello 0,80, interessando superfici delle aree di lavaggio dei formaggi e delle ricotte e della stagionatura.

Campioni di prodotto: per quanto riguarda i prodotti sono state riscontrate positività solo per *Listeria* spp con una prevalenza dello 0,24%. Le positività si sono riscontrate esclusivamente nel caseificio B a carico di campioni provenienti dai formaggi duri.

2.2.2 Valutazione del livello di contaminazione da *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes* su RTE commerciali.

Lo studio ha poi riguardato un'altra categoria di prodotti alimentari, quella relativa ai prodotti Ready To Eat (RTE). Infatti come precedentemente descritto, in Europa i prodotti alimentari maggiormente coinvolti in casi di Listeriosi negli ultimi anni erano rappresentati da RTE (EFSA 2011; EFSA 2012). Questi ultimi mostrano un rischio elevato in quanto rappresentano un substrato permissivo, hanno prolungata shelf-life a temperature di refrigerazione, sono confezionati in molti casi senza un trattamento

Listericida di risanamento e il loro consumo avviene senza cottura (FDA/FSIS 2001; FAO/WHO, 2004; CAC, 2007). Pertanto si proceduto con il campionamento di diverse tipologie di alimenti RTE disponibili in commercio presso punti di vendita al dettaglio. I campioni RTE includevano: formaggi porzionati, salumi affettati, insalate di mare, salmone affumicato e insalate di IV gamma, tutti pre-confezionati.

Materiali e Metodi

Complessivamente sono stati eseguiti tre campionamenti presso alcuni punti vendita della GDO, durante i quali sono stati prelevati 30 prodotti alimentari confezionati e pronti al consumo, scelti tra quelli che potevano rappresentare un potenziale rischio di contaminazione da *Listeria monocytogenes*. Questi prodotti tutti appartenenti alla categoria dei "ready to eat foods", erano rappresentativi di differenti categorie commerciali, quali: n. 8 formaggi, n. 2 insalate pronte a base di riso, n. 6 prodotti di IV gamma, n.7 prodotti a base di carne cotti e n. 7 prodotti ittici. Su ciascun campione è stata effettuata la ricerca qualitativa e quantitativa di *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes* (UNI EN ISO 11290-01:2005; UNI EN ISO 11290-02:2005). I campioni positivi sono stati sottoposti a test di conferma fenotipici (reazione alla catalasi, reazione all'ossidasi e colorazione di Gram). In seguito alle conferme fenotipiche sui campioni positivi è stata

eseguita la Polymerase Chain Reaction (PCR) per discriminare la presenza di *L. spp* e *L. monocytogenes*.

Risultati

Su 30 campioni analizzati sono state riscontrate positività per *listeria* spp su 2 campioni, mentre un solo campione è risultato positivo per *listeria monocytogenes*. Nello specifico la ricerca di *Listeria* spp secondo la metodica quantitativa ha mostrato, in tutti i campioni analizzati, valori inferiori al limite di sensibilità della metodica, mentre la ricerca qualitativa ha permesso l'isolamento e la successiva identificazione di specie in 2 campioni di cui in un salmone affumicato la positività era riferibile a *Listeria* spp e in un campione di Gorgonzola e Mascarpone la positività è stata riferita a *Listeria monocytogenes*.

2.2.3 Valutazione della contaminazione la *Listeria monocytogenes* in alimenti somministrati presso strutture ospedaliere.

Per lo studio del rischio associato ai prodotti somministrati o disponibili presso strutture ospedaliere, sono stati effettuati dei campionamenti presso un laboratorio privato di preparazione e somministrazione pasti distribuiti ai pazienti ospedalizzati.

2.2.3.1 Laboratorio di preparazione e somministrazione pasti

Altro gruppo di alimenti per cui è stato valutato il livello di contaminazione da *Listeria monocytogenes*, è quello relativo ai prodotti alimentari relativi alla categoria dei Ready To Eat (RTE), ma questa volta in relazione alla valutazione del rischio associato ai prodotti somministrati o disponibili presso strutture ospedaliere. In seguito alle difficoltà burocratiche riscontrate, si è dovuto procedere alla valutazione del livello di contaminazione presso un laboratorio di preparazione e somministrazione pasti che fornisce alimenti cotti e pronti al consumo per diverse strutture ospedaliere. Anche presso questa struttura sono stati eseguiti campionamenti ambientali su superfici a contatto e non a contatto con gli alimenti e sulle attrezzature. Contestualmente sono state eseguite analisi su campioni di prodotti alimentari pronti al consumo preparati o porzionati presso la struttura, da somministrare dopo alcune ore. Si è ritenuto escludere dal campionamento gli alimenti sottoposti a cottura, in quanto il trattamento termico sempre prolungato e superiore ai 70°C consentiva di devitalizzare tutte le forme vegetative eventualmente presenti sull'alimento pronto ed una eventuale presenza di contaminazione poteva essere indice di contaminazione ambientale post cottura. Le aree interessate sono state:

- Area salumi e formaggi
- Area carni
- Area frutta e verdura

- Cucina.

I siti di campionamento interessati mediante l'utilizzo di sponge bag sono stati:

- Canaletta area salumi e formaggi
- Frigorifero salumi e formaggi
- Superficie tagliere salumi e formaggi
- Carrello trasporto alimenti
- Macchina lava verdure
- Affettatrice carne
- Frigo carni
- Parete area cucina
- Scarico pentola.

Gli alimenti RTE analizzati sono stati:

- Insalata preconfezionata
- Formaggio semi stagionato
- Salame affettato.

Su tutti i campioni è stata effettuata la ricerca di *Listeria monocytogenes*, il tenore in germi a 30°C (CMT) (ISO 4833) e il parametro *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2). Non è mai stata rilevata la presenza di *Listeria monocytogenes*. Su un unico campione

ambientale, nello specifico sul carrello di trasporto alimenti, è stata rilevata la presenza di *Enterobacteriaceae* (2,60 log_{10}/cm^2). Su tutti i campioni la CMT era compresa tra 1,90 e 4,81 log_{10}/cm^2.

Sito	***L. monocytogenes***	***Enterobatteriaceae***	**Carica Microbica Totale a 30°C**
canaletta area salumi e formaggi	NR*	NR	2,95*
frigorifero salumi e formaggi	NR	NR	3,26
formaggio semistagionato	NR	NR	4,81
salame	NR	NR	4,39
tagliere salumi e formaggi	NR	NR	4,06
carrello trasporto alimenti	NR	2,60*	4,11
lavaverdure	NR	NR	4,08
insalata confezionata	NR	NR	2,76
affettatrice carne	NR	NR	3,68
frigorifero carni fresche	NR	NR	3,09
parete cucina	NR	NR	3,20
scarico pentola	NR	NR	1,90

*I valori riferiti alle superfici sono riportati in log_{10}/cm^2.

2.3 Costituzione di un network per l'attuazione di programmi di sorveglianza attiva.

Lo sviluppo e la successiva implementazione di sistemi di sorveglianza in grado di incrementare il monitoraggio epidemiologico nei casi clinici di listeriosi umana in relazione alla possibile origine alimentare, si è fondato principalmente sulla comunicazione tra gli operatori. Questo sistema di condivisione ha permesso l'immediata segnalazione del sospetto diagnostico e l'avvio di indagini complementari. Inoltre per aumentare la conoscenza su tutti i casi con sospetta sintomatologia ascrivibile a *Listeria monocytogenes* è stata svolta una approfondita indagine epidemiologica. È stata inoltre progettata e predisposta una scheda per la raccolta dei dati clinici ed epidemiologici dei soggetti clinici coinvolti. Su tutti i casi clinici segnalati sono stati raccolti campioni biologici per la ricerca e l'eventuale isolamento di *Listeria monocytogenes*. Contestualmente si è proceduto alla valutazione del possibile livello di esposizione dei consumatori in seguito all'ingestione di alimenti potenzialmente contaminati da *Listeria monocytogenes*. Per questo obiettivo è stata valutata la frequenza ed il livello di contaminazione in differenti categorie di prodotti alimentari. Si è proceduto alla valutazione del livello di rischio associato al consumo di prodotti lattiero caseari a base di latte ovino attraverso la valutazione del livello di contaminazione da *Listeria monocytogenes* su campioni ambientali e di prodotti alimentari, quali ricotte salate a base

di siero ovino e formaggi duri a lunga maturazione sempre a base di latte ovino, tra quelli con maggior rischio di contaminazione (Spanu et al., 2012; Ibba et al., 2013; Casti et al., 2016). Un'altra categoria valutata è stata quella relativa ai prodotti Ready To Eat (RTE), sono state campionate diverse tipologie di questi alimenti disponibili in commercio presso punti di vendita al dettaglio. Per la valutazione del livello di esposizione dei soggetti appartenenti alle categorie di rischio YOPI, si è inoltre proceduto alla valutazione del livello di contaminazione presso laboratori di preparazione e somministrazione pasti che forniscono alimenti pronti al consumo per diverse strutture ospedaliere. Anche presso queste strutture sono stati eseguiti campionamenti ambientali su superfici a contatto e non a contatto con gli alimenti e sulle attrezzature. Inoltre Pertanto si è deciso di valutare anche il rischio associato al consumo di Ready To Eat Sandwiches (RTES), come tramezzini, focacce e panini confezionati, disponibili presso distributori automatici accessibili a pazienti ospedalizzati e collocati in prossimità di reparti a elevato rischio come ostetricia e ginecologia, onco-ematologia, malattie infettive ecc. Su tutti i ceppi di *LM* isolati, sono stati eseguiti differenti test fenotipici, e successivamente, si è proceduto con tecniche biomolecolari, all'identificazione di genere e di specie. Su tutti gli isolati è stata effettuata la sierotipizzazione e lo studio dei geni codificanti i diversi fattori di virulenza. Si è poi proceduto allo studio della presenza di internaline tronche, mediante metodica *PCR-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP). Inoltre è stato

condotto uno studio di popolazione mediante *Pulse Field Gel Electrophoresis* (PFGE), secondo il protocollo Network Pulsnet. I ceppi sono stati inoltre sottoposti ad analisi mediante *Multilocus Sequence Typing* (MLST). La caratterizzazione dei ceppi raccolti si è conclusa con lo studio dell'antibiotico resistenza attraverso metodiche biomolecolari dei geni che codificano per alcuni antibiotici, tra quelli maggiormente utilizzati in terapia medica e veterinaria. Infine tutti i ceppi raccolti sono stati crioconservati a -80°C.

CAPITOLO 4

2.4 *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat sandwiches collected from vending machines

Francesca Cossu,[1] Carlo Spanu,[1] Silvia Deidda,[2] Erica Mura,[2] **Daniele Casti**,[1] Carlo Pala,[1] Sonia Lamon,[1] Vincenzo Spanu,[1] Michela Ibba,[1] Elena Marrocu,[1] Christian Scarano,[1] Andrea Piana,[2] Enrico Pietro Luigi De Santis[1].

[1] Università di Sassari, Dipartimento di Medicina Veterinaria; [2] Dipartimento Dipartimento di Scienze Biomediche e Igiene e Medicina Preventiva.

Pubblicato su: Italian Journal of Food Safety Safety (rivista con referee, indicizzata Scopus e PubMed e con quartile Q3), vol. 5, p. 61-64, ISSN: 2239-7132, doi: 10.4081/ijfs.2016.5500

Il contributo del Dottorando Dott. Daniele Casti alla stesura del presente contributo scientifico, ha riguardato le attività specifiche di campionamento e analisi di laboratorio, lettura e interpretazione dei risultati ottenuti, nonché il contribuito alla scrittura e alla ricerca bibliografica.

Nel periodo temporale compreso tra novembre 2014 e maggio 2015, sono stati eseguiti 4 differenti campionamenti. I campioni analizzati sono stati prelevati in maniera casuale da distributori automatici refrigerati presenti in 6 differenti ospedali (A, B, C, D, E, F) situati

in differenti zone della Sardegna. I Sandwiches erano composti da vari ingredienti: pane, pomodoro, insalata, formaggio, prosciutto, tonno, *salame milano*, *mortadella*, funghi, olive, maionese. In totale sono stati prelevati 55 campioni, 18 presso l'ospedale A, 21 presso l'ospedale B, 7 presso l'ospedale C e 5 dall'ospedale D. solamente 2 campioni sono stati prelevati dall'ospedale E e F. I campioni prodotti con tecnologie di processo simili da 5 differenti aziende, erano confezionati in atmosfera modificata (MAP). In seguito al prelievo dai distributori automatici, i campioni venivano trasportati in condizioni di refrigerazione, stoccati a 3-5°C presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria a Sassari (Italia) e analizzati entro 24 ore.

Analisi Microbiologiche

Tutte le analisi microbiologiche sono state effettuate secondo gli standard internazionali ISO. Sono stati valutati i seguenti parametri: carica mesofila totale CMT (ISO 4833-1:2013; ISO 2013), Enterobacteriaceae (ISO 21528-2:2004; ISO, 2004a) *L. monocytogenes* (ISO 11290-1/2:1996/amd 2004; ISO, 2004b, 2004c), *Pseudomonas* spp. (ISO/TS11059:2009; ISO, 2009), *Bacillus cereus* (ISO 7932:2004; ISO, 2004d), lieviti e muffe (ISO 6611/IDF 94, 2004; ISO, 2004e), *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002/amd 2007; ISO, 2007) e Stafilococchi Coagulasi Positivi (ISO 6888-1/2:1999/amd 2003; ISO, 2003a, 2003b). L'identificazione dei Coagulasi Negativi, è stata effettuata utilizzando il

Baird Parker + RPF agar (BioMerièux, Lion, France). Da ogni campione sono state ottenute in maniera sterile, 2 aliquote di 25 g. La prima aliquota veniva omogeneizzata con 225 ml di Buffered Peptone Water (BPW) (Biolife, Milano, Italia), mentre la seconda con 225 ml di supplemento selettivo Fraser Broth Base (Biolife) per l'isolamento e l'identificazione di *L. Monocytogenes*. Successivamente all'omogeneizzazione, sono state allestite diluizioni decimali seriali per la semina sui terreni agarizzati in piastra.

Identificazione di *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp.

Dai campioni positivi alla presenza di *Listeria* spp., sono state sottoposte ad identificazione molecolare 5 colonie. Sui ceppi confermati come *Listeria monocytogenes*, sono state identificate le sierovarianti (Doumith *et al*., 2004). I ceppi identificati come *Listeria* e *Listeria monocytogenes* sono stati tipizzati mediante identificazione biomolecolare API Listeria (BioMerièux). Allo stesso modo, 5 colonie con caratteristiche fenotipiche riconducibili a *Pseudomonas* spp. sono state sottoposte ad identificazione molecolare utilizzando specifici primers per *Pseudomonas* spp. (De Vos *et al*., 1997) e *Pseudomonas fluorescens* (Scarpellini *et al*., 2004). Tutti i ceppi sono stati conservati a -80°C in Brian Heart Infusion broth (Biolife) with glycerol (20% v/v).

Valutazione della composizione dello spazio di testa

La composizione della miscela dei gas all'interno della confezione è stata determinata mediante l'utilizzo del Dansensor gas analyser (Dansensor, Ringsted, Denmark). È stato applicato un foro sulla confezione, mediante l'utilizzo di un ago sterile connesso al Dansensor. Le percentuali di O_2 e CO_2 sono venivano rilevate direttamente dallo strumento, mentre la concentrazione di N_2 è stata calcolata per differenza.

Analisi fisico-chimiche

Il pH è stato misurato per infissione, mediante l'utilizzo del pHmetro GLP22 (Crison Instruments, Barcelona, Spain), mentre l'attività dell'acqua (a_W) è stata misurata sul prodotto omogeneizzato, mediante l'utilizzo dell'Aqualab 4TE (Decagon, Pullman, WA, USA). Sono state effettuate due differenti misurazioni, una sul campione intero (pane e farcia) e un'altra solamente sulla farcia.

Risultati e discussioni

Durante il lavoro sono stati analizzati un totale di 55 campioni. Tutti i campioni sono risultati positivi alla presenza di batteri aerobi mesofili. Le *Enterobacteriaceae* sono state rilevate nel 27,3% dei campioni, mentre nel 14,5% dei campioni, è stata rilevata la

presenza di lieviti e muffe. È stata rilevata un'elevata presenza di stafilococchi coagulasi negativi, col 45,5% di prevalenza. In nessun campione è stata rilevata la presenza di *B. cereus*, *Salmonella* spp. e stafilococchi coagulasi positivi. I risultati per ogni microrganismo sono riportati nella tabella 1.

In tutti i campioni analizzati col metodo di ricerca quantitativo, non è mai stata rilevata la presenza di *listeria* spp. attraverso il metodo di ricerca qualitativo (presenza/assenza in 25g di prodotto), *Listeria* spp. è stata isolata in 9 campioni provenienti da 3 diverse aziende. Su 3 campioni è stata rilevata la presenza di *Listeria monocytogenes*. Tutti i ceppi identificati come *Listeria monocytogenes* (15/45, 33%) appartenevano alla sierovariante 4b. Dei ceppi rimanenti (30/45, 66,6%), 11 sono stati identificati come *L. innocua* (24,4%), 11 *L. seeligeri* (24,4%), 7 *L. welshimeri* (15,5%) e 1 *L. grayi* (2,2%). *Pseudomonas* spp. è stato rilevato in 7 campioni (12,7%), con valori medi di contaminazione di 3,40±0,44 e un range di 2,9-4 log10 cfu/g, Su 35 isolati, 22 ceppi appartenevano a *Pseudomonas* spp, mentre 11 a *Pseudomonas fluorescens*. Valori medi della composizione dei gas di testa erano di 1,04%±2,48 (x±sd) per l'O_2 (range 0-10,5%), 16,36%±3,67 per la CO_2 (range 7,9-25,5%) e 82,60±2,99 per N_2 (range 74,5-87,7%). Il pH sul prodotto intero ha mostrato valori medi di 5,33±0,32 con un range compreso tra 4,65 e 5,91. Valori simili di pH sono stati rilevati nella farcia, con valori medi di 5,26±0,34 e un range compreso tra 4,49 e 5,95. Per quanto riguarda l'attività dell'acqua

(aw), sono stati misurati valori medi di 0,964±0,018 (x±sd) e un range compreso tra 0,915 e 0,994.

tabella 1: Profilo microbiologico dei Ready to Eat sandwiches venduti presso distributori automatici.

	aerobic mesophilic bacteria			enterobacteriaceae			yeasts and molds			coagulase-negative staphylococci		
Samplings	n. pos. (%)	mean±sd	min-max	n. pos. (%)	mean±sd	min-max	n. pos. (%)	mean±sd	min-max	n. pos. (%)	mean±sd	min-max
A	14 (100.0)	6.88±1.13	4.39-8.51	7 (50.0)	2.39±1.43	1.00-4.64	nd	nd	nd	13 (92.9)	3.60±0.92	2.30-5.08
B	11 (78.6)	6.21±1.30	3.78-7.81	5 (35.7)	2.15±0.62	1.60-3.10	8 (57.1)	3.28±0.91	2.30-4.87	5 (35.7)	3.19±0.71	2.48-4.15
C	13 (86.7)	6.19±1.06	4.00-7.41	3 (20.0)	1.66±0.22	1.48-1.90	nd	nd	nd	3 (20.0)	3.99±0.99	2.85-4.60
D	12 (85.7)	5.77±1.38	2.77-7.51	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4 (33.3)	3.12±1.04	1.57-3.78

SD, deviazione standard; nd, non rilevato.

Conclusioni

I prodotti RTE, sono generalmente suscettibili alla contaminazione di *L. monocytogenes*. Come dimostrato da numerosi studi, il rischio legato contaminazione del prodotto durante il processo produttivo, è elevato (Dawson *et al.*, 2006; Little *et al.,* 2008; Ibba *et al.*, 2013). Inoltre, secondo quanto stabilito dal Regolamento CE 2073/2005, le caratteristiche fisico chimiche (pH e aw) classificano i campioni analizzati come prodotto permissivo allo sviluppo di *L. monocytogenes*. Il rischio associato alla presenza di *L. monocytogenes* nei RTE, aumenta sensibilmente quando il prodotto viene commercializzato in ambienti particolarmente sensibili, come ospedali in cui le categorie suscettibili (YOPI) possono avere facile accesso. Lavori precedenti hanno dimostrato che i casi di listeriosi sono associati al consumo di RTE contaminati da *L. monocytogenes*. In questo lavoro, la prevalenza di *L. monocytogenes* nei campioni analizzati, è stata inferiore rispetto ad altri studi (Pesavento *et al.*, 2010). Nonostante tutti gli RTE analizzati, siano conformi ai criteri microbiologici stabiliti dal Regolamento CE 2073/2005, la loro disponibilità in ambiente altamente sensibili come ospedali, deve essere altamente controllata. Inoltre, la presenza di *Listeria* spp. su 9 campioni, è un indice chiaro della potenziale presenza di *L. monocytogenes* su questo tipo di alimento. Pertanto, al fine di limitare la possibile esposizione dei pazienti ospedalizzati a *L. monocytogenes,* sarebbe necessario offrire

maggiori informazioni in tali ambienti, legate al rischio associato alla presenza di *L. monocytogenes* nei RTE.

CAPITOLO 5

2.5 Studio del potenziale invasivo di ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da alimenti pronti al consumo reperibili in commercio

Il seguente lavoro è stato pubblicato negli abstract book al XXVI Convegno Nazionale dell'Associazione Italiana a Veterinari Igienisti dal titolo "*La gestione della sicurezza alimentare e i controlli ufficiali: nuovi approcci e tendenze in ambito nazionale e comunitario*". 2016, P021, pagina 27.

Vincenzo Spanu,[1] Carlo Spanu,[1] Francesca Cossu,[1] **Daniele Casti**,[1] Carlo Pala,[1] Erica Mura,[2] Silvia Deidda,[2] Sonia Lamon,[1] Michela Ibba,[1] Christian Scarano,[1] Andrea Piana,[2] Enrico Pietro Luigi De Santis[1].

[1] Università di Sassari, Dipartimento di Medicina Veterinaria; [2] Dipartimento di Scienze Biomediche e Igiene e Medicina Preventiva.

Il contributo del Dottorando Dott. Daniele Casti alla stesura del presente contributo scientifico, ha riguardato le attività specifiche di laboratorio, quali analisi e lettura e interpretazione dei risultati ottenuti, nonché il contribuito alla scrittura e alla ricerca bibliografica.

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare il potenziale invasivo di ceppi di *L. monocytogenes* isolati da alimenti *ready-to-eat* (RTE) disponibili in commercio. Lo

studio ha previsto la ricerca e la tipizzazione molecolare, mediante *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP), del gene codificante l'internalina A (*inlA*), per la valutazione della presenza di codoni di stop (PMSC).

Materiali e metodi

Prelievo dei campioni

Tra il 2014 e il 2015 sono stati prelevati dal commercio (supermercati e distributori automatici presso strutture ospedaliere) n.85 campioni rappresentativi di diverse tipologie di alimenti Ready To Eat (RTE) e Ready To Eat Sandwich (RTES). Sono stati prelevati alimenti che appartenessero alla categoria degli alimenti confezionati e pronti al consumo, scelti tra quelli con maggior rischio di contaminazione da *Listeria monocytogenes*. I campioni appartenevano a differenti categorie commerciali, quali: n.55 Ready To Eat Sandwich (RTES), tutti confezionati in MAP, e costituiti da prodotti da forno (pan carré e altri tipi di pane), farciti con diversi ingredienti, quali prodotti a base di carne (salame, prosciutto crudo, prosciutto cotto, mortadella ecc.), prodotti caseari (mozzarella, edamer), prodotti ittici (tonno), vegetali (funghi, pomodori, olive) e salse (maionese); n.3 confezioni di gorgonzola e mascarpone in vaschetta preincartato da circa 250 grammi; n.3 confezioni di formaggio grattugiato vaccino da circa 200 grammi; n.2 confezioni di formaggio "filante" preaffettato preincartato; n.2 confezioni di insalata di riso da circa 300 grammi, con ortaggi in proporzione variabile (peperoni, carciofi, olive, carote, piselli)

acqua, aceto di vino, olio di semi, zucchero, sale, aromi naturali, antiossidante acido ascorbico; n.6 buste di insalate miste pretagliate confezionate pronte al consumo; n. 3 confezioni prosciutto cotto preaffettato in MAP; n. 1 confezione prosciutto crudo preaffettato in map; n. 3 confezioni salame preaffettato in MAP; n.3 confezioni salmone affumicato preaffettato confezionato sottovuoto; n.3 confezioni di insalata di mare con crostacei e molluschi, aceto, olio di semi, sale, aromi naturali, antiossidanti; n.1 confezione di wurstel di salmone da 100 grammi. Immediatamente dopo il prelievo, i campioni sono stati trasportati in condizioni di refrigerazione presso i laboratori del settore di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Sassari a analizzati.

Isolamento e conta di *L. monocytogenes*

L'isolamento e la conta di *L. monocytogenes* sono stati eseguiti secondo la procedura ISO 11290-1/2:1996, Amd:2004, rispettivamente. Brevemente, sono stati prelevati 25 g di ciascun campione, addizionati a 225 ml di half Fraser broth e omogenati in stomacher per 2'. Per la conta di L. *monocytogenes*, dopo rivitalizzazione a 20° C per 60 minuti, è stata eseguita la semina diretta su terreno selettivo Agar Listeria Ottaviani Agosti (ALOA) posto a incubare a 37°C per 48 h. Per l'isolamento, sono stati effettuati l'arricchimento primario in half Fraser broth (30°C/24h) e l'arricchimento secondario in Fraser broth (37° C per 48h), con successiva semina su ALOA. Almeno 5 colonie ritenute sospette per

Listeria monocytogenes evidenziate su ciascuna piastra di ALOA (colonie verdi - blu circondate da alone opaco) sono state seminate in *Tryptic Soy Yeast Extract Agar plates* (TSYEA) e incubate per 24 h a 37 °C.

Estrazione del DNA genomico

Il DNA genomico è strato estratto dagli isolati utilizzando il *Wizard Genomic Purification* Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA) secondo le istruzioni del produttore. Da ciascuna piastra di TSYEA, una colonia veniva trasferita in 3 ml di *Brain Heart Infusion broth* (BHIb, Biolife, Italia) e posta ad incubare a 37°C per 24 h. Si procedeva quindi alla lisi delle cellule batteriche ponendole a contatto con EDTA 50 mM e lisozima (10 mg/ml), con incubazione a 37 ° C per 1 h. Successivamente, alla sospensione batterica veniva addizionata la Nuclei Lysis Solution, seguita da incubazione ad 80° C per 5 sec. Venivano poi aggiunti in sequenza: RNase Solution con incubazione a 37° C per 45' e Protein Precipitation Solution con incubazione a -20°C per 5'. Dopo centrifugazione, si procedeva al trasferimento del surnatante in Isopropanolo (AppliChem, Milano, Italia) che veniva a sua volta centrifugato a 13-16000 giri per 2'' e, dopo eliminazione del surnatante, addizionato a etanolo 70% (AppliChem, Milano, Italia). Dopo asportazione dell'etanolo, il pellet veniva risospeso in 100 µl di DNA Rehydration Solution e conservato a -20° C.

Identificazione di specie di *L. monocytogenes* e sierotipizzazione

La conferma di specie di *L. monocytogenes* species e la sierotipizzazione sono state effettuate mediante una PCR multiplex, secondo il protocollo di Doumith et al. (2004). Sono stati utilizzati i seguenti primer:

Gene target	Sequenza dei primer (5'-3')[a]	Prodotto (bp)	Sierovariante	Concentrazione primer
lmo 0737	F: AGGGCTTCAAGGACTTACCC R: ACGATTCTGCTTGCCATTC	691	LM sierovarianti 1/2a, 1/2c, 3a, 3c	1 µM
1118	F: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R: CGGCTTGTTCGGCATACTTA	906	LM sierovarianti 1/2c, 3c	1,5 µM
ORF2819	F: AGCAAAATGCCAAAACTCGT R: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471	LM sierovarianti 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e	1 µM
ORF 2110	F: AGTGGACAATTGATTGGTGAA R: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	LM sierovarianti 4b, 4d, 4e	1 µM
prs	F: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG R: CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	370	*Listeria* spp	0,2 µM

[a]: F: forward; R: reverse; LM: Listeria monocytogenes

La reazione di amplificazione veniva effettuata in un volume finale di 50 µl contenente: buffer PCR 5X (Flexi Buffer Green GoTaq, Promega), 0,2 mM di Dntps mix (10 mM, Sigma), i primers lmo 0737, lmo 1118, ORF2819, ORF 2110, prs alle concentrazioni indicate nella Tabella X, 2 mM di $MgCl_2$ (50 mM, Invitrogen), 2 U di Taq polimerasi (GOTAQ Hot start 5U/µl, Promega), 5 µl di DNA e infine H_2O milliq sterile fino al raggiungimento del volume finale. Il programma di amplificazione è stato effettuato

mediante Thermalcycler Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, USA) con i seguenti parametri: iniziale denaturazione a 94°C per 3', 35 cicli di amplificazione a 94°C per 0,40', 53°C per 1,15' e 72°C per 1,15' e un'estensione finale a 72°C per 7'. Successivamente, gli amplificati venivano sottoposti ad elettroforesi mediante gel di agarosio 2,5 % in tris-acetato-EDTA (TAE) 1X (Invitrogen, USA). Le immagini venivano visualizzate mediante impiego del Gel-Doc UV trans illuminator (Bio-Rad, USA) ed elaborate con il software Quantity-One (Bio-Rad, USA).

Analisi di restrizione (PCR-RFLP) di *inlA*

Su 17 isolati confermati di *L. monocytogenes* si è proceduto all'amplificazione di un frammento del gene *inlA* da 733 bp, utilizzando i *primers* seq01 (5'-AATCTAGCACCACGTTCGGG-3') e seq02 (5'-TGTGACCTTCTTTTACGGGC-3'), secondo il protocollo di Rousseaux *et al.* (2004). La reazione di amplificazione è stata realizzata in un volume totale di 50 µl contenente: 5 µl di buffer PCR 5X (Flexi Buffer Green GoTaq, Promega), 0,2 mM di Dntps mix (10 mM, Sigma), 1,5 mM $MgCl_2$, i primers ad una concentrazione di 0,5 µM ciascuno, 1,25 U di Taq polimerasi (GOTAQ Hot start 5U/µl, Promega), 5 µl di DNA e infine H_2O milliq sterile fino al raggiungimento del volume finale mediante Thermalcycler Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, USA) con i seguenti parametri: iniziale denaturazione a 94°C per 4', 30 cicli di amplificazione a 94°C per 0,30', 52°C per 1' e 72°C per 2,5' e un'estensione finale a

72°C per 7'. Successivamente, gli amplificati venivano sottoposti ad elettroforesi mediante gel di agarosio 2,5 % in tris-acetato-EDTA (TAE) 1X (Invitrogen, USA). Le immagini venivano visualizzate mediante impiego del Gel-Doc UV trans illuminator (Bio-Rad, USA) ed elaborate con il software Quantity-One (Bio-Rad, USA).

I prodotti di PCR ottenuti sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione AluI e Tsp509I (New England Biolabs, Ipswich, MA, Stati Uniti) rispettivamente alla temperatura di 37 e 65°C per 4 ore (Rousseaux *et al.* 2004). I frammenti sono stati separati mediante elettroforesi con gel di agarosio al 3,5%.

I profili di restrizione sono stati visualizzati ed analizzati utilizzando il software Quantity One (BioRad, Hercules, CA, Stati Uniti) al fine di ottenere dei profili compositi, classificati dalla A alla E.

Risultati

I profili compositi B, C ed E sono rappresentativi del gene *inlA* completo, mentre i profili A e D del gene *inlA* tronco, per presenza di PMSC. Il 7,65% dei campioni (8 sandwich e 1 salmone affumicato) sono risultati contaminati da *Listeria* spp., mentre in 3 campioni (2 sandwich e 1 gorgonzola e mascarpone) è stata rilevata la presenza di *L. monocytogenes*. I ceppi di *L. monocytogenes* isolati dal campione di gorgonzola e mascarpone appartenevano alla siero-variante 1/2b, mentre quelli isolati dai sandwich appartenevano alla sierovariante 4b.

Discussione e Conclusioni

L'analisi visiva dei profili di restrizione ha mostrato che tutti gli isolati erano ascrivibili al profilo 1 per l'enzima AluI e al profilo 2 per l'enzima Tsp509I. Dalla combinazione dei profili 1 e 2 è stato ottenuto il profilo composito di tipo B, ascrivibile al gene *inlA* completo, senza PMSC nella sequenza nucleotidica. La presenza nei RTE analizzati di *L. monocytogenes* con un potenziale di invasività inalterato suggerisce che debba essere posto un maggiore livello di attenzione e soprattutto di informazione, quando questi particolari RTE sono destinati a consumatori appartenenti alle suddette categorie a rischio (YOPI).

CAPITOLO 6

6.0 Studio dei ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati

Per completare lo studio condotto, si riportano i dati ottenuti dalla caratterizzazione fenotipica e genotipica condotte sui ceppi di Listeria monocytogenes, isolati durante le attività di ricerca del presente elaborato e da altre attività non comprese condotte da altre Unità Operativa non descritte dal presente elaborato (Le attività descritte nel presente capitolo, sono state effettuate in ambito del progetto di ricerca "*Strategie di sorveglianza attiva e networking per il controllo delle infezioni da Listeria monocytogenes*" finanziato da Legge Regionale 7 Agosto 2007, n. 7)

Durante le attività sperimentali condotte, sono stati isolati diversi ceppi di Listeria monocytogenes, una selezione di questi è stata caratterizzata da un punto di vista fenotipico e genotipico. Questi ceppi selezionati sono inoltre stati messi a confronto con una ulteriore selezione di ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da campioni biologici di origine umana. Complessivamente sono stati caratterizzati n.6 isolati da campioni biologici di origine umana e n.31 isolati da matrici alimentari e superfici, su questi isolati sono stati eseguiti test fenotipici per una prima discriminazione (colorazione di Gram, catalasi, mobilità e attività emolitica).

Identificazione e sierotipizzazione

Su tutti i ceppi selezionati si è proceduto all'identificazione di genere e di specie mediante PCR, e mediante multiplex PCR è stata valutata l'appartenenza ai differenti sierotipi, amplificando le regioni geniche Imo0737, lmo1118, ORF2819, ORF2110 e il gene prs utilizzato come controllo positivo (Doumith et al., 2004). Lo studio ha permesso di identificare 3 principali sierovarianti: 19 ceppi (51,3%) appartenevano alla sierovariante 4b, 13 alla 1/2a (35,1%) e 5 (13,5%) alla 1/2b. Nessuno apparteneva alla sierovariante 1/2c. Nello specifico dei 6 stipiti umani, 2 ceppi appartenevano alla sierovariante 4b e 4 alla 1/2a, a confermare che il sierotipo 1/2a sta gradualmente sostituendo il 4b come sierotipo prevalentemente nei casi di listeriosi umana.

Valutazione dei diversi fattori di virulenza presenti

È stata inoltre valutata, mediante multiplex PCR, la presenza dei geni codificanti i diversi fattori di virulenza e di patogenicità quali:

- proteina polimerizzante l'actina (actA);
- listeriolisina O (hlyA);
- proteina di invasione (iap);
- fosfolipasi B (plcB) e A (plcA);
- internaline A e B (inlA, inlB);

- gene prfA che regola la trascrizione dei suddetti fattori.

Tutti i n.37 isolati sono risultati positivi per la presenza dei 7 geni di virulenza analizzati.

Studio della presenza di internaline tronche.

Le internaline, riscontrabili nel genoma di Listeria monocytogenes isolata da alimenti e ambiente, riducono il potere invasivo del microrganismo. Su tutti i ceppi è stata valutata la presenza di codoni di stop nel gene inlA utilizzando la metodica PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Dopo l'amplificazione mediante simplex PCR di un frammento del gene inlA di 733 paia di basi, utilizzando i primers seq01 e seq02, l'amplificato è stato sottoposto a digestione enzimatica (enzimi AluI e Tsp509I). I profili di compositi di restrizione ottenuti, sono stati utilizzati per confermare l'eventuale presenza di internaline tronche. Su tutti i 37 ceppi è stata rilevata la presenza del tratto target del gene inlA. L'analisi dei profili compositi di restrizione, ha evidenziato che in tutti gli isolati, era presente il gene inlA di tipo intero, con assenza di codoni di stop.

Studio di popolazione

Su tutti gli isolati, si è proceduto allo studio di popolazione mediante Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE), secondo il protocollo adottato dal Network Pulsnet con l'utilizzo degli enzimi di restrizione AscI e ApaI e come ceppo di riferimento *Salmonella* sierotipo Braenderup (H9812). I fingerprinting ottenuti sono stati sottoposti, attraverso l'utilizzo

del software GelCompar II, ad una cluster analysis, usando il coefficiente di similarità di Dice. Inoltre, per trarre maggiori informazioni sul grado di "similarità" tra gli stipiti esaminati, ai pattern ottenuti è stato applicato il metodo UnweightedPair-Group Method of Average. La PFGE eseguita su 37 stipiti di Listeria monocytogenes isolati, ha identificato la presenza di 5 diversi pulsotipi (A, B, C, D, E), raggruppati in due clusters: nel primo, sono raggruppati gli stipiti appartenenti ai pulsotipi A, B e C; al secondo cluster appartengono i pulsotipi D ed E. I pulsotipi A ed E sono stati rilevati da stipiti isolati sia dall'uomo che da alimenti; al pulsotipo C e D appartengono solo stipiti di origine alimentare; ed al pulsotipo B solo stipiti di origine umana. Complessivamente la similarità tra i 5 clusters è del 31,91%.

Multilocus Sequence Typing (MLST)

I ceppi sono stati sottoposti all'analisi mediante la metodica Multilocus Sequence Typing (MLST), attraverso l'analisi di sequenza con l'utilizzo di primer che amplificano per 7 geni housekeeping, quali:

- abcZ (ABC transporter);
- bglA (beta glucosidase);
- cat (catalase);
- dapE (succinyl diaminopimelate desuccinylase);
- dat (D-amino acid aminotransferase);

- ldh (L-lactate dehydrogenase);
- lhkA (histidine kinase).

Quindi, si è proceduto al sequenziamento ed alla successiva analisi del sequence type grazie all'utilizzo del programma Bioedit (freeware). Le sequenze ottenute, sono state inserite nel sito dell'Istituto Pasteur per valutare la "*percentuale di identità*" e la compatibilità delle sequenze alleliche ottenute, successivamente confrontate con quelle depositate nella banca dati dell'Istituto Pasteur. La variabilità genomica riscontrata con la PFGE è stata confermata anche con l'analisi di sequenza, sono stati distinti 5 diversi ST: ST1, ST5, ST8, ST101, ST121. Appare interessante notare che gli stipiti del pulsotipo A appartengono al ST8; quelli del pulsotipo B al ST121; quelli del pulsotipo C al ST5; gli stipiti del pulsotipo D al ST101; e quelli del pulsotipo E al ST1.

Studio dell'antibiotico resistenza

Su tutti i ceppi è stata valutata l'antibiotico resistenza, attraverso metodiche biomolecolari dei geni che codificano per alcuni antibiotici. La scelta degli antibiotici da testare è ricaduta su quelli maggiormente utilizzati in terapia medica e veterinaria. Mediante simplex e multiplex PCR e utilizzando i primers descritti da Morvan et al. (2010), sono stati ricercati:

- presenza dei geni tetK, tetL, tetM e tetS, che codificano per la resistenza alla tetraciclina;
- presenza dei geni erm per la resistenza al macrolide eritromicina;
- presenza del gene aad per la streptomicina;
- presenza del gene cat per il cloramfenicolo.

Dai risultati ottenuti è possibile affermare che nessuno dei ceppi ha mostrato la presenza dei determinanti genetici ricercati, che codificano per la resistenza ai suddetti antibiotici.

CAPITOLO 7

7.0 Conclusioni

La listeriosi è una zoonosi ad origine alimentare, associata al consumo di alimenti contaminati. Nell'ambito delle malattie trasmesse da alimenti, *l'European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), ha inserito la Listeriosi insieme a Salmonellosi, Campylobacteriosi, infezioni da *Escherichia coli* verocitotossico, Shighellosi ed Yersiniosi. Nonostante questa attenzione le indagini epidemiologiche condotte sui casi di listeriosi sono molto spesso complicate da una serie di fattori. Questi sono principalmente legati all'ampia diffusione e persistenza ambientale del microrganismo, dalla diffusa contaminazione di alcune categorie di prodotti alimentari e dalle specifiche caratteristiche delle categorie di consumatori considerate a rischio. È questo il motivo per il quale sia la Comunità Europea che altre nazioni a livello globale, favoriscono e promuovono la creazione di reti di sorveglianza in grado di rendere più efficiente la comunicazione e incrementare lo studio e la segnalazione dei casi di listeriosi. L'incidenza della listeriosi non è tra le più elevate tra le malattie trasmesse da alimenti, ed è, come già detto, caratterizzata dalla bassa prevalenza nelle matrici alimentari e negli ambienti. Attualmente non si hanno dati specifici in riferimento alla Sardegna, l'unico dato in grado di dare una stima è relativo al decennio precedente le attività progettuali. Molto spesso il nesso causale tra caso clinico e alimento è di difficile dimostrazione. Il presente elaborato,

come detto, è parte integrante di un più ampio progetto di ricerca che aveva come obiettivo la necessità di sviluppate programmi di sorveglianza della listeriosi attraverso lo sviluppo di protocolli in grado di incrementare il monitoraggio epidemiologico nei casi clinici di listeriosi umana, in relazione alla possibile origine alimentare. Il lavoro ha permesso di ottenere il risultato prefissato, infatti i soggetti coinvolti nella ricerca, hanno attivato un sistema di sorveglianza e di comunicazione che permette l'immediata segnalazione del sospetto diagnostico e attiva le indagini complementari. Su tutti i casi clinici segnalati sono stati raccolti campioni biologici per la ricerca e l'eventuale isolamento di *Listeria monocytogenes*. Il livello di esposizione dei consumatori in seguito all'ingestione di alimenti potenzialmente contaminati da *Listeria monocytogenes* è stato valutato in differenti categorie di prodotti alimentari. I risultati ottenuti mostrano una diffusa contaminazione da *Listeria monocytogenes* sia sugli alimenti selezionati che su diverse superfici degli stabilimenti di produzione. Questa contaminazione è nella maggior parte dei casi ridotta e quasi sempre conforme ai limiti di legge. Appare però di notevole importanza la criticità relativa alla possibile ingestione di questi alimenti da parte delle suddette categorie di consumatori a rischio. Inoltre in alcuni casi il rischio è notevolmente aumentato dalla accessibilità degli stessi a pazienti ospedalizzati o alla loro collocazione in prossimità di reparti a elevato rischio come ostetricia e ginecologia, onco-ematologia, malattie infettive ecc. In conclusione possiamo affermare che i dati ottenuti rappresentano

un importante strumento per la prevenzione e lo studio della diffusione della listeriosi. Infatti appare di fondamentale importanza lo sviluppo di programmi di sorveglianza attiva come strumento per la valutazione dell'incidenza della patologia, in quanto consentono la caratterizzazione dei ceppi isolati e la scoperta e lo studio dei differenti cluster. Questi dati consentono inoltre di confermare o escludere l'origine alimentare e l'eventuale contaminazione lungo la filiera.

Bibliografia

1. "**Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 2006**," Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), vol. 58, no. 22, pp. 609–615, 2009.
2. **A. Juliàn**, A. Jiménez, M. De Gòrgolas, R. Fernàndez, and M. L. Fernàndez, "Infecciones por Listerìa monocytogenes en el adulto. Aspectos clìnicos y microbioìogicos de una enfermedad cambiante," Enfermedades Infecciosas y Microbìologia Clinica, vol. 19, pp. 297–303, 2001.
3. **Alexander AV**, Walker RL, Johnson BJ, Charlton BR,Woods LW(1992) Bovine abortions attributable to *Listeria ivanovii*: four cases (1988- 1990). J Am Vet Med Assoc 200:711–714.
4. **Allerberger F**. Wagner M. (2010) "Listeriosis: a resurgent foodborne infection". Clin Microbiol Infect; 16:16–23.
5. **APHA-American Public Health Association**. (2001). DOWNES & ITO (Coord.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, *1*, 431-438.
6. **B. Lorber**, "*Listeria monocytogenes*," in Principles and Practice of Infectious Diseases, G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin, Eds., p. 2707, Churchill Livingstone, Philadelphia, Pa, USA, 7th edition, 2010.

7. **B. Swaminathan** and P. Gerner-Smidt, "The epidemiology of human listeriosis," Microbes and Infection, vol. 9, no. 10, pp. 1236–1243, 2007.
8. **Bertrand S**., Huys G, Yde M, D'Haene K, Tardy F, Vrints M, Swings J, Collard JM. Detection and characterization of tet (M) in tetracycline resistant *Listeria* strains from human and food-processing origins in Belgium and France, J. Med. Microbiol, 2005. 54:1151e1156.
9. **Bertsch D**., Rau J, Eugster MR, HaugMC, Lawson PA, Lacroix C, Meile L (2013) *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. Int J Syst Evol Microbiol 63:526–532. doi:10.1099/ijs.0.036947–0.
10. **Beumer R**., M. Te Giffel, E. Spoorenberg, and F. Rombouts. 1996. *Listeria* species in domestic environments. Epidemiol. Infect. 117: 437–442.
11. **Bille J**, Catimel B, Bannerman E, Jacquet C, Yersin MN, Caniaux I, Monget D, Rocourt J (1992) API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. Appl Environ Microbiol 58:1857–1860.
12. **Casti D**., Scarano C., Pala C., Cossu F., Lamon S., Spanu V., ... & Spanu, C. (2016). Evolution of the microbiological profile of vacuum-packed ricotta salata cheese during shelf-life. Italian journal of food safety, 5(2).
13. **Centers for Disease Control and Prevention**. 2012. Multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen Farms, Colorado. Available

at: http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html. Ultimo accesso 4 settembre 2017.

14. **CFIA** (2011). Sampling and Testing (Chapter 5) in Meat Hygiene Manual of Procedures of the Canadian Food Inspection Agency. http://www.inspection.gc.ca/food/meat-and-poultry-products/manual-of-procedures/chapter-2/eng/1358520040538/1358522359572. Ultimo accesso il 01/10/2017.
15. **Chand P**, Sadana JR (1999) Outbreak of Listeria ivanovii abortion in sheep in India. Vet Rec 145:83–84.
16. **Charpentier E**., and Courvalin P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. Antimicrob Agents Chemother, 1999. 43:2103–2108.
17. **Charpentier E**., Gerbaud G., Jacquet C., Rocourt J. and Courvalin P., 1995. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. Journal of Infectious Diseases 172, 277– 281.
18. **Chiara M.**, Caruso M., D'Erchia A.M., Manzari C., Fraccalvieri R., Goffredo E., Latorre L., Miccolupo A., Padalino I., Santagada G., Chiocco D., Pesole G., Horner D.S., Parisi A. (2015) Comparative genomics of *Listeria* sensu lato: genus-wide differences in evolutionary dynamics and the progressive gain of

complex, potentially pathogenicityrelated traits through lateral gene transfer. Genome Biol Evol 7: 2154–2172. doi:10.1093/gbe/evv131.

19. **Chmielewski R. A. N**., & Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *2*(1), 22-32.
20. **Ciolacu L**., Nicolau, A. I., & Hoorfar, J. (2014). *Edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables* (pp. 233-244). Woodhead Publishing: Sawston, UK.
21. **Conter M**, Paludi D, Zanardi E, Ghidini S, Vergara A, Lanieri A. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*, Int J Food Microbiol, 2009. 128(3):497–500.
22. **Cossart Pascale** and Alejandro Toledo-Arana. "*Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview." *Microbes and Infection* 10.9 (2008): 1041-1050.
23. **Cossart Pascale**, Javier Pizarro-Cerda, and Marc Lecuit. "Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions." *Trends in cell biology* 13.1 (2003): 23-31.

24. **Cox L**., T. Kleiss, J. Cordier, C. Cordellana, P. Konkel, C. Pedrazzini, R. Beumer, and A. Siebenga. 1989. *Listeria* spp. in food processing, non-food and domestic environments. Food Microbiol. 6:49–61.

25. **Cummins A.J.**, Fielding A.K., McLauchlin J. (1994) *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. J Infect 28:89–91.

26. **Dawson SJ**, Evans MR, Willby D, Bardwell J, Chamberlain N, Lewis DA, 2006. *Listeria* outbreak associated with sandwich consumption from a hospital retail shop, United Kingdom. Euro Surveillance 11:89-91.

27. **de Valk H**., C. Jacquet, V. Goulet et al., "Surveillance of *listeria* infections in Europe," Eurosurveillance, vol. 10, no. 10, pp. 251–255, 2005.

28. **de Vos D**., Lim A. Jr, Pirnay J.P., Struelens M., Vandenvelde C., Duinslaeger .L, Vanderkelen A., Cornelis P., 1997. Direct detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, oprI and oprL. J Clin Microbiol 35:1295-9.

29. **den Bakker HC**, Manuel CS, Fortes ED, Wiedmann M, Nightingale KK (2013) Genome sequencing identifies *Listeria fleischmannii* subsp. *coloradonensis* subsp. *nov*., isolated from a ranch. Int J Syst Evol Microbiol 63:3257–3268. doi:10.1099/ijs.0.048587–0.

30. **den Bakker HC**, Warchocki S, Wright EM, Allred AF, Ahlstrom C, Manuel CS, Stasiewicz MJ, Burrell A, Roof S, Strawn LK, Fortes E, Nightingale KK, Kephart D, Wiedmann M (2014) *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. Int J Syst Evol Microbiol 64:1882–1889. doi:10.1099/ijs.0.052720–0.

31. **Dongyou Liu**. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborn pathogen, Journal of medical Microbiology, 2005; 645-659.

32. **Dons L**., Rasmussen O.F., Olsen J.E., 1992. Cloning and characterization of a gene encoding flagellin of *Listeria monocytogenes*. Molecular Microbiology 6, 2919–2929.

33. **Doumith M**., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P, 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. J Clin Microbiol 42:3819-22.

34. **Dussurget O**., (2008) "New insights into determinants of *Listeria monocytogenes* virulence". Int Rev. Cell Mol. Biol. 270:1-38.

35. **Endrikat S**., D. Gallagher R. Pouillot H. H. Quesenberry D. LaBarre C. M. Schroeder, and J. Kause. 2010. A comparative risk assessment for *Listeria*

monocytogenes in prepackaged versus retail sliced deli meat. J. Food Prot. 73:612–619.

36. **European Commission**. 2005. Regulation of the European Parliament and of the Council of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, 2073/2005/CE. In: Official Journal, L338/1, 22/12/2005.
37. **European Food Safety Authority (EFSA)** and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2016; The European Union summary report on trends and sourcesof zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015, approved: 21 November 2016 doi: 10.2903/j.efsa.2016.4634.
38. **European Food Safety Authority**. 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. EFSA J. 9:2090.
39. **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.
40. **Farber J**. M., and P. I. Peterkin. "*Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen." *Microbiological reviews* 55.3 (1991): 476-511.
41. **Farber J. M**., G. K. Kozak, and S. Duquette. 2011. Changing regulation: Canada's new thinking on *Listeria*. Food Control 22: 1506–1509.

42. **FDA (Food and Drug Administration)**. (2008). Guidance for Industry: Control of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods; Draft Guidance. U.S. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. https://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/UCM535981.pdf. Accessed 01/10/2017.

43. **Fenlon D. R**. 1999. Listeria monocytogenes in the natural environment, p. 21–38. In E. T. Ryser and E. H. Marth (ed.), *Listeria*, listeriosis, and food safety, 2nd ed. Marcel Dekker, New York.

44. **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.

45. **FSIS U.** (2014). Isolation and identification of *Salmonella* from meat, poultry, pasteurized egg, and catfish products and carcass and environmental sponges. Microbiology laboratory guidebook, 4. ISO 690.

46. **Gaillard JEAN-LOUIS**, et al. "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 (1987): 2822-2829.

47. **Gasanov U**. Hughes D. Hansbro PM. (2005) "Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*" FEMS Microbiology Reviews (29). 851-875.
48. **Georgnaras I** and Holy AV. Antimicrobial susceptibility of isolates of *Staphylococcus aureus*, *Listeria* species and *Salmonella* serotypes associated with poultry processing, Int J Food Microbiol, 2001. 70: 29–35.
49. **Gianfranceschi M**. V., D'Ottavio M. C., Gattuso A., Bella A., Aureli P. (2009) "Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates (Italy 2002–2005)" Food Microbiol. 26:520-526.
50. **Gill PA**, Boulton JG, Fraser GC, Stevenson AE, Reddacliff LA (1997) Bovine abortion caused by *Listeria ivanovii*. Aust Vet J 75:214.
51. **GMA (Grocery Manufacturers Association)** (2014). *Listeria monocytogenes* Guidance on Environmental Monitoring and Corrective Actions in At-risk Foods. http://ucfoodsafety.ucdavis.edu/files/208833.pdf. Accessed 01/10/2017.
52. **Goebel W**. Kreft J., Bockmann R. (2000) "Regulation of virulence genes in pathogenic *Listeria* spp." in: Gram-positive pathogens. American society for microbiology. Washington DC. 2000. pp.499-506.
53. **Gómez D**, Ariño A, Carramiñana Juan J, Rota C, Yangüela J. Sponge versus mini-roller for the surface microbiological control of *Listeria monocytogenes*, total

aerobic mesophiles and *Enterobacteriaceae* in the meat industry, Food Control, 2012. 27:242e247.

54. **Gómez D**, Azón E, Marco N, Carramiñana Juan J, Rota C, Ariño A, Yangüela J. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* innocua from meat products and meat-processing environment, Food Microbiology, 2014. 42: 61e65

55. **Gottlieb S. L**., E. C. Newbern, P. M. Griffin, L. M. Graves, R. M. Hoekstra, N. L.Baker, S. B. Hunter, K. G. Holt, F.Ramsey, andM. Head. 2006. Multistate outbreak of listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy. Clin. Infect. Dis. 42:29–36.

56. **Gracieux P**., Roche S.M., Pardon P., Velge P. (3003) Hypovirulent *L.monocytogenes* strains are less frequently recovered than virulent strains on PALCAM and Rapid'L.mono media. Int. J. Food Microbiol. 83, 133-145.

57. **Graves L.M.**, Swaminathan B, Hunter SB. Subtyping *Listeria monocytogenes*, in ET Ryser, EH Marth. *Listeria*, Listeriosis, and food safety, 3rd edition, 2007; 283-299

58. **Gray M**. L., & Killinger, A. H. (1966). Listeria monocytogenes and listeric infections. *Bacteriological reviews*, *30*(2), 309.

59. **Gray M.C**., Freitag NE, Boor KJ. How the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde, Infection and Immunuty, 2006, Vol. 74, No. 5; 2505-2512.

60. **Guillet C**., Join-Lambert O., Le Monnier A., Leclercq A., Mechai F., Mamzer-Bruneel M.F., Bielecka M.K., Scortti M., Disson O., Berche P., Vazquez-Boland J., Lortholary O., Lecuit M. (2010) Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. Emerg Infect Dis 16:136–138.

61. **Halter E.L**., Neuhaus K., Scherer S., 2013. *Listeria weihenstephanensis sp. nov*., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 63 (2), pp. 641-647.

62. **Harris K**. & Blackwell J. (1999). Guidelines for Developing Good Manufacturing Practices (GMPs), Standard Operating Procedures (SOPs) And Environmental Sampling/Testing Recommendations(ESTRs) Ready-to-Eat (RTE) Products.

63. **Hernandez-Milian** A., & Payeras-Cifre A. (2014). What is new in listeriosis? *BioMed research international*, *2014*.

64. **Hernandez-Milian Almudena** and Antoni Payeras-Cifre. "What is new in listeriosis?." *BioMed research international* 2014 (2014).

65. **Hof H**., 2003. History and epidemiology of listeriosis. FEMS Immunology and Medical Microbiology 35, 199- 202.

66. **Hof H**., and P. Hefner. (1988) "Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison to other *Listeria* spp." infection 16 (suppl. 2):141-144.

67. **HPA (Health Protection Agency)**. (2009) Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods. London: Health Protection Agency.

68. http://www.epicentro.iss.it/problemi/listeria/epid1.asp, ultimo accesso 30/09/2017.

69. **Huang B**., Fang N, Dimovski K., Wang X., Hogg G., Bates J. Observation of a new pattern in serogroup-related PCR typing of *Listeria monocytogenes* 4b isolates. J Clin Microbiol. 2011.49(1):426-9

70. **Ibba M**., Cossu F., Spanu V., Virdis S., Spanu C., Scarano C., & De Santis, E. P. (2013). *Listeria monocytogenes* contamination in dairy plants: evaluation of *Listeria monocytogenes* environmental contamination in two cheese-making plants using sheeps milk. Italian Journal of Food Safety, 2(2), 31.

71. **International Commission on Microbiological Criteria for Foods** (2002). Microbiological testing in food safety management. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

72. **ISO 1996/Amd 1**. (2004a). Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: detection method. ISO Norm 11290-1. International Standardization Organization ed., Geneva, Switzerland.
73. **ISO 1998/Amd 1. (2004b).** Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 2: enumeration method. ISO Norm 11290-2. International Standardization Organization ed., Geneva, Switzerland.
74. **ISO 2002**. Microbiology of food and animal feeding stuffs horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. ISO 6579. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
75. **ISO P**. (2004). 18593-2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
76. **ISO, 1999a**. Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the enumeration of Coagulase-Positive *Staphylococci* (*Staphylococcus aureus* and other species): ISO 6888–1:1999. Part 1: technique using Baird-Parker Agar Medium. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
77. **ISO, 1999b**. Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the enumeration of Coagulase-Positive *Staphylococci* (*Staphylococcus aureus* and other species): ISO 6888–2. Part 2: technique using Rabbit-Plasma Fibrinogen Agar Medium. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.

78. **ISO, 2003**. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganisms: colony count technique at 30°C. ISO Norm 4833. International Standardization Organization ed., Geneva, Switzerland.
79. **ISO, 2004**. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. Part 1: detection and enumeration by colony count technique. ISO Norm 21528-2. International Standardization Organization ed., Geneva, Switzerland.
80. **ISO, 2004**. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* and colony-count technique at 30°C. ISO Norm 7932. International Standardization Organization ed., Geneva, Switzerland.
81. **ISO, 2004**. Milk and milk products, Enumeration of colony forming units of yeast and moulds. Colony count technique at 25 °C. ISO Norm 6611. International Standardization Organization ed., Geneva, Switzerland.
82. **ISO, 2009**. Milk and milk products. Method for the enumeration of *Pseudomonas* spp. ISO/TS Norm 11059:2009 (IDF/RM 225:2009). International Standardization Organization ed., Geneva, Switzerland.
83. **Jadhav S**., Bhave M., Palombo E.A. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*, Journal of Microbiological Methods, 2012. 327-341
84. **Kathariou S**., Kanenaka R., Allen R.D., Fok A.K., Mizumoto C., 1995. Repression of motility and flagellin production at 37 degrees C is stronger in

Listeria monocytogenes than in the nonpathogenic species *Listeria innocua*. Canadian Journal of Microbiology 41, 572–577.

85. **Kovacevic J**., Sagert J., Wozniak A., Gilmour M.W., Allen KJ. Resistance and coselection phenomenon in *Listeria* spp. recovered from food and food production environments, Food Microbiology, 2013. 34(2):319-27.
86. **Kreft J**., Vazquez-Boland J.A. (2001) "Regulation of virulence genes in *Listeria*" Int.J. Med.Microbiol. 291. 145-157.
87. **Leclercq A.**, Clermont D., Bizet C, Grimont P.A., Le Fleche-Mateos A., Roche SM, Buchrieser C, Cadet-Daniel V, Le Monnier A, Lecuit M, Allerberger F (2010) *Listeria rocourtiae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 60:2210–2214. doi:10.1099/ijs.0.017376-0.
88. **Leclerq A**. (2004) Atypical colonial morpholgy and low recovery of *L. monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'L.mon and ALOA solid media. J. of Microbiological Methods, 57, 252-258.
89. **Lessing MP**, Curtis GD, Bowler IC (1994) *Listeria ivanovii* infection. J Infect 29:230–231.
90. **Linnan M**. J., L.Mascola, X. D. Xiao Dong Lou et al., "Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese," *The New England Journal of Medicine*, vol. 319, no. 13, pp. 823–828, 1988.

91. **Lismond A**, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP, Courvalin P, VanBambeke F Cooperation between prokaryotic (Lde) and eukaryotic (MRP) efflux transporter in J774 macrophages infected with *Listeria monocytogenes*: studies with ciprofloxacin and moxifloxacin. Antimicrob. Agents Chemother, 2008. 52:3040e3046.

92. **Little CL**, Barrett NJ, Grant K, McLauchlin J, 2008. Microbiological safety of sandwiches from hospitals and other health care establishments in the United Kingdom with a focus on *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. J Food Protect 71:309-18.

93. **M. E. Temple** and M. C. Nahata, "Treatment of listeriosis," *Annals of Pharmacotherapy*, vol. 34, no. 5, pp. 656–661, 2000.

94. **Mata, G. M. S. C**., Martins, E., Machado, S. G., Pinto, M. S., Carvalho, A. F. D., & Vanetti, M. C. D. (2016). Performance of two alternative methods for *Listeria* detection throughout Serro Minas cheese ripening. *brazilian journal of microbiology*, *47*(3), 749-756.

95. **McLauchlin J**, Rees C (2009) Genus I. *Listeria Pirie* 1940a 383AL. In:Vos P et al. (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 3, 2 edn. Springer, New York, pp. 244–257.

96. **McLauchlin J**., Mitchell R.T., Smerdon W.J., Jewell K., "*Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods", Int. J. Food Microbiol., p. 15-33 (2004).

97. **Morvan, A**., Moubareck, C., Leclercq, A., Hervé-Bazin, M., Bremont, S., Lecuit, M., ... & Le Monnier, A. (2010). Antimicrobial resistance of Listeria monocytogenes strains isolated from humans in France. Antimicrobial agents and chemotherapy, 54(6), 2728-2731.

98. **MPI (2012)** Guidance for the Control of Listeria monocytogenes in Ready-to-eat Foods Part 3: Monitoring Activities. Ministry for Primary Industries, New Zeland Government. https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/16306-guidance-for-the-control-of-listeria-monocytogenes-in-ready-to-eat-foods-part-3-monitoring-activities. Accessed 01/10/2017.

99. **Muhterem-Uyar**, M., Dalmasso, M., Bolocan, A. S., Hernandez, M., Kapetanakou, A. E., Kuchta, T., ... & Rovira, J. (2015). Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control*, *51*, 94-107.

100. **Nakamura. H**., Hatanaka. M., Ochi. K., Nagao. M., Ogasawara. J., Hase. A., Kitase. T., Haruki. K., Nishikawa. Y., (2004). "*Listeria monocytogenes*

isolated from cold-smoked fish products in Osaka City. Japan". Int. J. Food Microbiol. 94. 323–328

101. **Norma, I. S. O. (2004).** 18593: 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs. ISO, 18593.

102. **NSW (2008)**. Food Autority for meat processors and retail meat licensees. *Listeria* Management Program NSW/FA/FI034/0809. http://www.foodauthority.nsw.gov.au/_Documents/industry/listeria_management_program.pdf. Accessed 01/10/2017.

103. **Okamoto M**., Nakane A., Minagawa T. "Host resistance to an intragastric infection with *Listeria monocytogenes* in mice dependes on cellular immunity and intestinal bacterial flora", Infect. Immun. 62, p. 3080-3085 (1994).

104. **Olier, M**., F. Pierre, J. P. Lemaitre, C. Divies, A. Rousset, and J. Guzzo. 2002. Assessment of the pathogenic potential of two *Listeria monocytogenes* human faecal carriage isolates. Microbiology 148:1855–1862.

105. **P. Cossart**, "Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview," International Journal of Medical Microbiology, vol. 291, no. 6-7, pp. 401–409, 2001.

106. **PHE (Public Health England)**. (2014). Detection and enumeration of bacteria in swabs and other environmental samples. Microbiology Services Food

Water and Environmental Microbiology Standard Method. https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/329432/Detection_and_enumeration_of_bacteria_in_swabs_and_other_environmental_samples.pdf. Accessed 01/10/2017.

107. **Pini, PN**, Gilbert, RJ,. The occurrence in the UK of Listeria species in raw chickens and soft cheeses. Int. J. Food Microbiol.,1988. 6, 317-326

108. **Pradhan, A. K., R**. Ivanek, Y. T. Gro□hn, R. Bukowski, I. Geornaras, J. N. Sofos, and M. Wiedmann. 2010. Quantitative risk assessment of listeriosis-associated deaths due to *Listeria monocytogenes* contamination of deli meats originating from manufacture and retail. J. Food Prot. 73:620–630.

109. **Prencipe V**., Rizzi V., Acciari V., Iannetti L., Giovannini A., Serraino A., Calderone D., Rossi A., Morelli D., Marino L., Migliorati G., Caporale V. (2012). *Listeria monocytogenes* prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain. Food Control. 25. 150–158. 10.1016/j.foodcont.2011.10.018.

110. **Ramage CP**, LowJC, McLauchlin J,DonachieW(1999) Characterisation of *Listeria ivanovii* isolates from the UK using pulsed-field gel electrophoresis. FEMS Microbiol Lett 170:349–353.

111. **Renato H. Orsi** & Martin Wiedmann, 2016. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since

2009. Appl Microbiol Biotechnol (2016) 100:5273–5287 doi:10.1007/s00253-016-7552-2.

112. **Roche S.M**., Kerouanton A., Minet J., Le Monnier A., Brisabois A., Velge P. Prevalence of low-virulence *Listeria monocytogenes* strains from different foods and environments. Int. J. of Food Microbiol. 130, 151-155 (2009).

113. **Rocourt J.** (1996) "Risk factors for listeriosis" Food Control. 7. 195-202.

114. **Rocourt J**. and Buchrieser C., 2007. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. In Listeria, Listeriosis and Food Safety, pp. 1–20. Edited by E. T. Ryser & E. H. Marth. Boca Raton: CRC Press.

115. **Ryser E.T**., (1999) "Foodborne listriosis" p.299-358 in "*Listeria*, listeriosis and food safety". 2nd edition, edited by E.T. Ryser and E.H. Marth. Marcel Dekker. New York.

116. **S. Bajard**, L. Rosso, G. Fardel, and J. P. Flandrois, "The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under sub-optimal conditions," International Journal of Food Microbiology, vol. 29, no. 2-3, pp. 201–211, 1996.

117. **Sacchetti R**., Bianucci F., Ambrogiani E. (2003) Detection of *L.monocytogenes* in foodstuffs using chromogenic isolation media. New Microbiol. 26, 269-274.

118. **Sauders, B. D., K**. Mangione, C. Vincent, J. Schermerhorn, C. M. Farchione, N. B. Dumas, D. Bopp, L. Kornstein, E. D. Fortes, K. Windham, and M. Wiedmann. 2004. Distribution of *Listeria monocytogenes* molecular subtypes among human and food isolates from New York State shows persistence of human disease–associated *Listeria monocytogenes* strains in retail environments. J. Food Prot. 67:1417–1428.

119. **Sauders, B. D., M. D**. Sanchez, D. H. Rice, J. Corby, S. Stich, E. D. Fortes, S. E. Roof, and M. Wiedmann. 2009. Prevalence and molecular diversity of *Listeria monocytogenes* in retail establishments. J. Food Prot. 72:2337–2349.

120. **Scallan E**, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM (2011) Foodborne illness acquired in the United States–major pathogens. Emerg Infect Dis 17:7–15.

121. **Scarpellini M**, Franzetti L, Galli A, 2004. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. FEMS Microbiol Lett 236:257-60.

122. **Schlech W**. F.. 2010. Update on clinical aspects of listeriosis: What's new?. Porto. Atti XVII International Symposium on Problems of Listeriosis.

123. **Seeliger H. P. R. .J**. Rocourt. A. Schrettenbrunner. P. A. D. Grimont. D.Joners. (1984) "*Listeria ivanovii* spp." Nov. int. j. syst. Bacyeriol. 34:336-337.

124. **Sergeant ES**, Love SC, McInnes A (1991) Abortions in sheep due to *Listeria ivanovii*. Aust Vet J 68:39.

125. **Snapir YM**, Vaisbein E, Nassar F (2006) Low virulence but potentially fatal outcome-*Listeria ivanovii*. Eur J Intern Med 17:286–287. doi: 10.1016/j.ejim.2005.12.006.

126. **Sokolovic Z**., Fuchs A., Wuenscher M., Goebel W. (1990) "Synthesis of species-specific stress proteins by virulent strains of *Listeria monocytogenes*". Infect. Immun. 58. 3582-3587.

127. **Spanu, C**., Scarano, C., Spanu, V., Penna, C., Virdis, S., & De Santis, E. P. L. (2012). *Listeria monocytogenes* growth potential in Ricotta salata cheese. International dairy journal, 24(2), 120-122.

128. **Srinivasan V**, Nam HM, Nguyen LT, Tamilselvam B, Murinda SE and Oliver SP. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms, Foodborne Path Dis 2005. 2: 201–211.

129. **Swaminathan B**. (2001) "*Listeria monocytogenes*" in: Food Microbiology: fundamentals and frontiers. 2nd edition, edited by M.P.Doyle. ASM press. Washington. D.C.

130. **Tompkin, R. B**. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of food protection*, *65*(4), 709-725.

131. **Troxler R**., Von Graevenitz A.,Funke G., Wiedemann B., Stock I., 2000. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes, L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. Clinical Microbiology and Infection 6, 525-535.

132. **V. Goulet** and P. Marchetti, "Listeriosis in 225 non-pregnant patients in 1992: clinical aspects and outcome in relation to predisposing conditions," Scandinavian Journal of Infectious Diseases, vol. 28, no. 4, pp. 367–374, 1996.

133. **Va□zquez-Boland**, J. A., G. Domı´nguez-Bernal, B. Gonza□lez-Zorn, J. Kreft, and W. Goebel. 2001. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. Microb. Infect. 3:571–584.

134. **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.

135. **Vazquez-Boland J. A**., Kuhn M., Berche P., Chakraborthy T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J., Kreft J., "*Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants", Clinical Microbiology Reviews, Vol. 14, n. 3, p. 584-640 (2001).

136. **Wang H. L**., K. G. Ghanem, P. Wang, S. Yang, and T. S. Li, "Listeriosis at a tertiary care hospital in beijing, China: high prevalence of nonclustered

healthcare-associated cases among adult patients," Clinical Infectious Diseases, vol. 56, no. 5, pp. 666–676, 2013.

137. **Weller D**, Andrus A, Wiedmann M, den Bakker HC (2015) *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. Int J Syst Evol Microbiol 65:286–292. doi:10.1099/ijs.0.070839-0.

138. **Wiedmann M**. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*, Wiedmann: Journal of AOAC international, 2002; Vol 85, No. 2