

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
Facoltà di Medicina Veterinaria
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale
Laboratorio di Prova di Igiene e Tecnologia Alimentare

DOTTORATO DI RICERCA IN
“METODOLOGIE ANALITICHE NELLA TECNOLOGIA ALIMENTARE E
NELL’ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE”
XIX ciclo - VET/04

Ricerca di *Listeria monocytogenes* nella macellazione
dei suini

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Roberto Rosmini

Tesi di Dottorato di:

Dr. Adolfo Pallotti

Docente Guida:

Chiar.mo Prof. Roberto Rosmini

Triennio 2004/2006

Introduzione

Listeria monocytogenes è l'agente eziologico della listeriosi, una zoonosi, che l'uomo contrae principalmente attraverso il consumo di alimenti di origine animale contaminati. Come la maggior parte delle zoonosi trasmesse da alimenti, è caratterizzata di solito da un quadro clinico lieve, con sintomi, prevalentemente di natura gastroenterica, che insorgono in forma acuta e sono spesso auto-limitanti. A volte le conseguenze sono però più gravi, infatti *L. monocytogenes* può causare la meningite e l'encefalite nei soggetti con sistema immunitario defedato, infezioni ad esito fatale nei feti e nei neonati. (1, 2)

I dati di incidenza della listeriosi in Europa non sono preoccupanti (0.03 casi ogni 100.000 abitanti), ma sono sottostimati a tal punto da far ritenere che rispecchino la situazione reale soltanto limitatamente agli episodi delle forme invasive. (3, 4, 5)

Gli alimenti principalmente coinvolti nella trasmissione di *L.monocytogenes* all'uomo sono i prodotti lattiero – caseari, (6) in particolare i formaggi a pasta molle ottenuti da latte non pastorizzato, (7) le carni, (6, 8) i prodotti ittici e le verdure.(8)

Essendo una zoonosi trasmissibile attraverso il consumo di alimenti contaminati e per le conseguenti ripercussioni che può avere sulla salute pubblica e l'economia, la listeriosi è inclusa nella Direttiva

Europea 2003/99, riguardante il monitoraggio delle zoonosi e degli agenti zoonotici: è stata recepita in Italia con il Decreto numero 191 del 04 aprile 2006 ed è menzionata nell'allegato 1, tra “le zoonosi e gli agenti zoonotici che devono essere sottoposti a sorveglianza.” (9, 10)

L’attenzione nei confronti di *L. monocytogenes* da parte dell’industria alimentare, ed in particolare da parte di coloro che si occupano della filiera suina, si deve anche alle possibili restrizioni al commercio che possono essere stabilite come conseguenza del riscontro di eventuali contaminazioni dei prodotti pronti per il consumo. Grazie all’accordo sulle misure sanitarie e fitosanitarie, ratificato il 1° gennaio 1995 dall’Organizzazione Mondiale per il Commercio (WTO), un Paese può infatti applicare restrizioni alle importazioni di animali e prodotti di origine animale per proteggere la salute dei propri cittadini.

Attualmente, per i macelli autorizzati all’esportazione negli Stati Uniti dei prodotti a base di carne come ad esempio il prosciutto, sono in vigore disposizioni per i controlli e le misure da adottare al fine di garantire l’applicazione delle normative statunitensi con riferimento in particolare alla ricerca di *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp.

L. monocytogenes è una specie ubiquitaria che si trova soprattutto nel suolo, nelle piante, nelle acque superficiali e nei liquami. Per quanto riguarda gli animali, numerose sono le specie di mammiferi domestiche e selvatiche che possono essere infettate (7, 11) e serbatoi possono essere anche artropodi, uccelli, pesci e crostacei.(12, 13) Tra i mammiferi domestici sono soprattutto i bovini e gli ovi-caprini ad essere più frequentemente colpiti dalla listeriosi, mentre i suini solo raramente sviluppano la malattia, in quanto generalmente fungono da portatori asintomatici, così come gli uccelli. (13)

La carne di suino e i suoi derivati possono essere inquinati da *L. monocytogenes*, ma per quanto *L. monocytogenes* venga isolata dalle carni di suino con una certa frequenza, non è ancora chiaro da dove provenga. (14)

Nel tragitto “dall’allevamento alla tavola” in effetti sono diversi i passaggi a rischio per la moltiplicazione e diffusione di *L. monocytogenes*: l’allevamento, (15) la macellazione, (16) le operazioni di sezionamento e trasformazione, (17, 18) lo stoccaggio a temperature di refrigerazione, nonché la preparazione prima del consumo a livello di case, mense. (14)

Se la contaminazione degli allevamenti dipende principalmente dall’igiene dell’allevamento e dal tipo di alimentazione che viene data ai suini, (15) per le operazioni di sezionamento e trasformazione si ipotizza che le contaminazioni tra materie prime, superfici di contatto, utensili ed operatori giochino un ruolo fondamentale, (19) Al macello, invece, la presenza di *L. monocytogenes* nelle carni suine è discussa. Per alcuni Autori è da imputare agli stessi suini, (14, 20, 24) e ad inadeguate procedure di pulizia e disinfezione, (24) mentre per altri, *L. monocytogenes* rappresenta un problema principalmente di natura ambientale dovuto anche ad animali infestanti, come ad esempio i ratti. (21, 23)

Inoltre, alcuni studi prodotti negli ultimi anni hanno identificato i macelli quasi come una fonte a se stante di questo microrganismo. In particolare, è stata riscontrata una maggiore incidenza negli ambienti di sezionamento delle mezzene rispetto a quelli in cui avviene la macellazione. (14, 22)

Ad avvalorare l’ipotesi che la macellazione non sia responsabile della successive contaminazioni della filiera suina sono anche le differenze

nelle percentuali di isolamento dei singoli sierotipi tra animali, carcasse e prodotto finiti (21) e l'isolamento di ceppi appartenenti a pulsotipi differenti negli stabilimenti di macellazione e sezionamento (22)

Secondo Rørvik e coll. (1995), riportati da Nesbakken, lo stesso fenomeno si rileverebbe negli stabilimenti per la lavorazione e trasformazione del pesce, dove i ceppi di *L. monocytogenes* isolati dagli ambienti e dai prodotti finiti non corrispondono a quelli che si isolano generalmente dal pesce e dall'acqua di mare. (23)

Lo sviluppo negli ultimi anni di nuove tecnologie utili per il sequenziamento del genoma, associato alla mancata definizione di alcune questioni, come la patogenesi e la definizione della relazione dose/risposta, hanno portato ad un approfondimento su base cellulare e molecolare dello studio di *L. monocytogenes*. Grazie a questo nuovo filone di ricerca sono stati individuati nuovi fattori di virulenza e di patogenicità, tra cui il gene *bsh* e il sistema della glutammato decarbossilasi (GAD), che possono essere interessanti per le applicazioni che ne possono derivare. Il *bsh* è un gene che codifica una idrolasi dei sali biliari (BSH), riportata come essenziale per lo sviluppo della listeriosi nelle cavie, mentre il GAD (glutammato decarbossilasi) è un sistema enzimatico, grazie al quale *L. monocytogenes* è in grado di modulare il pH all'interno del citoplasma, quando è esposta in ambienti acidi. (25, 26)

In sintesi, con questo studio, vorremmo valutare i livelli di prevalenza di *L. monocytogenes* in alcuni stabilimenti di macellazione dei suini, considerando in particolare il ruolo dei portatori fecali.

Inoltre, vorremmo verificare se i ceppi isolati alla fine delle operazioni di macellazione siano in grado di persistere lungo filiera suina rappresentando quindi un pericolo per il consumatore.

***Listeria monocytogenes* e listeriosi**

Listeria monocytogenes

Il genere *Listeria*, inserito nella Divisione II, Sezione 14 del Bergey's Manual (27) prende il nome dal suo scopritore, il chirurgo inglese Lord J. Lister. (28)

Comprende sei specie: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. murray* (subsp. *grayi*, subsp. *murray*) e *L. innocua* (30) di cui soltanto alcune possono essere patogene.

A parte *L. monocytogenes*, che è la più importante perché provoca la listeriosi, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* (13, 31, 32) e *L. welshimeri* (32) raramente sono state causa di malattia per l'uomo; mentre *L. innocua* è stata identificata come responsabile di batteriemia ad esito fatale in un solo episodio, avvenuto in Francia nel 2003 ai danni di una donna di 62 anni d'età. (33)

Le listerie sono piccoli bacilli (1-1.5 μ m) pleomorfi e Gram-positivi che tendono a disporsi a "palizzata" o "a lettere cinesi"¹.

Aerobie-anaerobie facoltative, ossidasi negative, incapaci di ridurre i nitrati a nitriti, sono catalasi positive e capaci di idrolizzare l'esculina ad esculetina. Sono sprovviste di capsula, asporigene e mobili per la presenza di flagelli peritrichi. (34) La mobilità è cosiddetta

¹ Per questa ragione le listerie sono state assimilate ai corinebatteri, da cui però sono separati. (12)

“rocambolesca” e si rileva soltanto nei ceppi che crescono a 25°C.

(32)

L. monocytogenes, in aggiunta, fermenta il ramnosio ma non lo xilosio, è β-emolitica e mostra una reazione emolitica sinergica con *Staphilococcus aureus* nel cosiddetto Camp test (da Christie, Atkins e Munch-Peterson). (30, 31, 35) In realtà, non tutti i ceppi di *L. monocytogenes* risultano emolitici, in quanto non tutti producono una emolisina, chiamata listeriolisina-O (LLO).(8, 32)

	B-emolisi	Fermentazione Ramnosio	Fermentazione Xilosio	CAMP test	
				<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>murray</i>	-	V	-	-	-

Tabella 1: quadro delle reazioni utilizzate per l'identificazione delle specie appartenenti al genere *Listeria*. “V”: variabile; “(+)”: reazione debole; “+”: reazioni positive in più del 90% dei ceppi; “-”: nessuna reazione. (30)

Vero è che tutti i ceppi patogeni sono emolitici, (8, 32) e la loro virulenza varia sensibilmente da ceppo a ceppo.(36)

Nonostante ciò tutti i ceppi di *L. monocytogenes*, anche quelli debolmente patogeni e non-patogeni, che raramente vengono isolati, devono essere considerati come potenziali agenti di malattia (8) in quanto non è stata ancora individuata una correlazione tra i fattori di

virulenza e capacità di provocare o meno manifestazioni morbose.
(13)

Basandosi sui differenti antigeni somatici e flagellari si distinguono 13 sierotipi di *L. monocytogenes* che (8, 37) sono suddivisi in 5 gruppi principali 1, 2, 3, 4 a e 4 b (34) e non sono specie-specifici.² (28) I sierotipi più ricorrenti (>95%) negli isolati clinici umani sono: 1/2 a , 1/2 b e 4 b; (8, 13, 32) mentre negli alimenti si reperiscono con maggiore frequenza 1'1/2 a , 1'1/2 b e 1'1/2 c. (8)

Per quanto riguarda le caratteristiche fisico-chimiche, *L. monocytogenes* è in grado di moltiplicarsi a temperature di refrigerazione (psicrotrofia), a pH compresi tra 4.6 e 9.2, e con valori di attività dell'acqua (a_w) superiori a 0.90-0.92. Non è particolarmente resistente al calore rispetto alle altre specie Gram-positive (questo dato dipende comunque dalla dose iniziale) e in assenza di materiali organici, è sensibile a vari disinfettanti tra cui l'ipoclorito di sodio e i sali quaternari d'ammonio. (32) Cresce inoltre in presenza di concentrazioni di NaCl superiori al 10%. (38)

I batteri del genere *Listeria* sono ubiquitari, si trovano nel suolo, nell'acqua, sulle piante e negli insilati, (8) per quanto riguarda gli animali numerose sono le specie di mammiferi che possono essere infettate, nonché quelle di uccelli, pesci e crostacei. (12, 13)

Listeriosi

Incidenza

I dati riportati dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) indicano che l'incidenza della listeriosi umana in Europa è pari a 0.03 casi ogni 100.000 abitanti. Le denunce durante il 2004

² Dei sedici sierotipi del genere *Listeria*, uno soltanto è specie specifico: il 5, che è stato identificato come *L. ivanovii*. (29)

sono state 1267 nei Paesi membri della Comunità Europea (11) 1439 quelle nel 2005 (7).³ E' da notare, che in Germania è stato rilevato un incremento del 72% (da 296 a 510) del numero dei casi nel 2005 rispetto all'anno precedente. (7) Sulle possibili cause stanno indagando in quanto un tale aumento non si spiegherebbe soltanto con la recente introduzione nel 2001 del sistema di notifica obbligatoria. (39)

In Italia i casi di listeriosi vengono segnalati al Ministero della Salute attraverso il Sistema di notifica obbligatoria delle malattie infettive che è in vigore, seppur in forma modificata, dal 1934. (4) Tra il 1995 ed il 2004 sono stati registrati in media 41 episodi/anno. (40) Su questo dato incidono in particolar modo i 68 casi registrati nel 1997, quando circa 1500 persone furono coinvolte in una epidemia derivata dal consumo di insalata di mais e tonno contaminata. (41)

Dalle stime del CDC (Centre for Diseases Control), ottenute per estrapolazione dei dati di ospedalizzazione, i casi di listeriosi negli Stati Uniti ammonterebbero invece a duemilacinquecento ogni anno, di cui circa cinquecento sono ad esito fatale. (41) In termini di incidenza, secondo dati preliminari, nel 2005 sarebbero stati 0.03 i casi ogni 100.000 abitanti nelle aree sorvegliate attraverso il programma Foodnet (42)⁴

³ I dati del 2005 sono stati ottenuti considerando l'ampliamento a 25 del numero dei Paesi membri della Comunità europea.

⁴ E' da notare che, fatta eccezione per alcune epidemie causate dal consumo di alimenti contaminati e coinvolgenti un ampio numero di persone in un ambito territoriale circoscritto, di solito non vengono considerati gli episodi di listeriosi intesa come patologia gastroenterica. (3) Infatti, quando sono notificate, le forme gastroenteriche sono comunque comprese tra le malattie dell'apparato digerente che causano diarrea infettiva e per le quali di solito non si cerca l'agente eziologico. (4)

Patogenesi

Le manifestazioni morbose della listeriosi dipendono dallo stato di salute e dall'età dell'ospite, dalle proprietà di virulenza e di patogenicità dei ceppi, e dalla dose infettante. Il meccanismo patogenetico è incentrato sulla capacità dei ceppi di *L. monocytogenes* di moltiplicarsi e diffondersi all'interno dell'ospite passando da una cellula all'altra. Sfruttando alcuni fattori di virulenza, tra cui le internaline A e B, la listeriolisina (LLO) e l'actina, *L. monocytogenes* non si espone infatti nell'ambiente extracellulare evitando così i meccanismi di difesa rappresentati da anticorpi e sistema del complemento. L'unica difesa efficace dell'ospite sembra sia rappresentata dalla risposta cellulo-mediata ed in particolare dai linfociti T citotossici. (8, 31, 43, 44)

Sintomatologia

Dal punto di vista clinico, due sono le forme più frequenti nell'uomo: la listeriosi invasiva e la listeriosi gastroenterica.

La forma invasiva interessa principalmente i feti, i neonati, gli anziani e i soggetti immunodepressi. Nei feti l'infezione avviene in seguito al passaggio di *L. monocytogenes* attraverso la placenta al feto. L'esito dipende dall'epoca del contagio: si può avere aborto, nato morto o sepsi neonatale. I neonati invece contraggono l'infezione durante il parto, di solito per assunzione attraverso le vie aeree o la via digerente di liquido amniotico o di secrezioni vaginali contaminate. La forma neonatale può esordire precocemente, con sepsi accompagnata da

insufficienza respiratoria e circolatoria (alt tasso di mortalità), oppure comparire a distanza anche di alcune settimane con sepsi o meningite.⁵ Nelle donne gravide la listeriosi di solito si presenta con i sintomi di una sindrome simil-influenzale.

Gli adulti defedati o immunodepressi sviluppano invece più frequentemente una meningite che evolve in quadri di encefalite o rombo-encefalite. (2, 31)

In altri casi la listeriosi può essere caratterizzata da una manifestazione infiammatoria localizzata, tra cui le più riportate sono: congiuntivite, linfadenite, in particolare a carico dei linfonodi cervicali, dermatite da contatto ed endocardite. (2, 31, 34, 43, 44)

Negli animali la listeriosi si presenta con alcune differenze a seconda delle specie. Si distinguono le forme setticemica, neurologica ed abortigena, che sono frequenti soprattutto in bovini, pecore e capre. Negli equini prevale invece la forma meningo-encefalica, mentre nei suini e nei volatili si ha setticemia seguita da sintomi di natura nervosa.

I suini contraggono raramente la listeriosi. Gli uccelli di solito sono portatori asintomatici, si ammalano eventualmente nelle prime settimane di vita e muoiono improvvisamente.

Nei ruminanti si può riscontrare anche la mastite da *Listeria monocytogenes* e una forma che interessa l'occhio, caratterizzata da cherato-congiuntivite. (13, 34)

I quadri sintomatologici negli animali si presentano talvolta con le stesse modalità viste per l'uomo: ad esempio la forma neurologica nei ruminanti compare soprattutto negli animali adulti, mentre quella

⁵ La sepsi contratta per via trans-placentare può indurre l'insorgenza di granulomi diffusi a vari organi, tra cui fegato, reni e polmoni, da cui il nome granulomatosis infantiseptica.

setticmica, fatta eccezione per gli ovini dove non ci sono distinzioni in base all'età, predilige gli animali giovani.

Meccanismi di resistenza dell'ospite

Entrando nell'apparato gastroenterico, *L. monocytogenes* prima di invadere le cellule dell'ospite, deve superare alcuni ostacoli tra cui, l'acidità dei succhi gastrici e l'azione battericida esercitata dalla bile che dipendono in parte e rispettivamente dall'attività BSH-asica e glutammasica. (26)

Bile

La bile è un liquido di origine epatica, costituito in particolare da acqua, sali biliari, pigmenti biliari, colesterolo e lecitina. Di color giallo verdastro, (45) ha funzioni digestive ed è in grado di svolgere anche un'azione antimicrobica, alterando la permeabilità e la struttura delle membrane batteriche. Il tipo di azione dipende principalmente dalla concentrazione dei sali biliari e dalla composizione della bile considerata. (46) La concentrazione dei sali biliari è più alta nella bile colecistica rispetto a quella secreta direttamente dal fegato, (45) mentre per quanto riguarda la composizione, essa varia a seconda delle specie. In particolare, la bile suina ha un'azione antimicrobica più efficace rispetto a quella bovina, in quanto ad influire sulle capacità battericide è il numero gruppi idrossilici costituenti gli acidi biliari: quelli con due gruppi idrossilici, presenti nella bile suina,

entrano nella cellula batterica più velocemente degli acidi biliari della bile bovina, che sono caratterizzati tre gruppi idrossilici. (

Inoltre, la bile suina è anche quella che assomiglia maggiormente alla bile umana, almeno per quanto riguarda i rapporti sali biliari/colesterolo, fosfolipidi/colesterolo e glicina/taurina. (46)

Considerando il comportamento dei batteri nei confronti della bile, sappiamo che la tolleranza verso di essa è minore nei batteri Gram-positivi (46) ed è una caratteristica che differisce da ceppo a ceppo. (46, 47)

Inoltre la tolleranza dipende dalla temperatura di crescita, dal pH e dalla concentrazione salina del terreno di coltura. (46, 48)

Attività BSH-asica

Le idrolasi dei Sali biliari (BSH) sono degli enzimi capaci di degradare i Sali biliari, idrolizzando il legame amidico tra la molecola steroidea degli acidi biliari e gli aminoacidi (glicina/taurina) coniugati. Si tratta di enzimi identificati da tempo, presenti in numerose specie batteriche appartenenti alla normale microflora intestinale. (48, 49)

Recentemente è stato scoperto che anche le listerie hanno attività BSH-asica: tale attività è stata riscontrata in *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*; manca invece nelle specie non patogene: *L. grayi*, *L. innocua* e *L. welshimeri*. A codificare il BSH nelle listerie, è il gene omonimo *bsh*, (25, 50) che è controllato dal gene *sigB* e regolato come altri fattori di virulenza dall'attivatore di trascrizione PrfA. (25, 49)

Riguardo al ruolo dell'attività BSH-asica sono state avanzate tre ipotesi: la prima considera la deconiugazione dei Sali biliari come un modo utilizzato dai batteri per liberare la catena aminoacidica che può

così essere impiegata per l'approvvigionamento di carbonio, azoto ed energia. La seconda suppone che l'attività idrolasica, agevolando l'inserimento del colesterolo o della bile all'interno delle membrane batteriche, determini delle modificazioni strutturali come ad esempio della fluidità di membrana, da cui ne risulterebbe un vantaggio per la persistenza nell'intestino. La terza, la più verosimile secondo Begley e coll., è quella secondo cui le BSH, deconiugando i sali biliari, svolgerebbero un'azione di tipo detossificante e sarebbero quindi da correlare con la capacità dei batteri di tollerare la bile. In assenza di *bsh*, infatti, si riduce la concentrazione minima inibente (MIC) della bile e dei sali biliari. (46) Quello che è certo, è che il *bsh* è un fattore di virulenza, importante per la persistenza di *L. monocytogenes* nell'apparato gastroenterico e per lo svolgersi del ciclo oro-fecale. (50) Comunque il *bsh* non è l'unico fattore coinvolto nella resistenza alla bile, infatti è già stato dimostrato che anche il gene *btlB* è coinvolto. (51)

Sistema della Glutammato-decarbossilasi

In condizioni di acidità, essendo un batterio aerobio-anaerobio facoltativo, *L. monocytogenes* può avvalersi del sistema di trasporto dei protoni accoppiati agli elettroni della catena respiratoria, oppure impiegare molecole che utilizzano l'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP per trasportare all'esterno della cellula i protoni, al fine di mantenere l'omeostasi del pH all'interno del citoplasma.

Quando è presente acido glutammico, in aggiunta entra in funzione un altro meccanismo di resistenza, il sistema della glutammato-decarbossilasi (GAD). (52)

Il GAD è un sistema enzimatico che agisce incrementando il valore del pH all'interno del citoplasma della cellula batterica ed alcalinizzando contemporaneamente l'ambiente extra-cellulare.

Una molecola di acido glutammico tramite una proteina di trasporto viene portata nel citoplasma batterico e decarbossilata in γ -amminobutirrato (GABA), con consumo di un protone. Il GABA successivamente viene scambiato con una nuova molecola di acido glutammico all'esterno della cellula batterica. In questo modo, si perde un protone a livello del citoplasma, mentre nell'ambiente extracellulare si accumula il γ -amminobutirrato che è alcalinizzante rispetto all'acido glutammico. (14, 49, 52, 53)

Il GAD non è esclusivo della *L. monocytogenes*, ma è stato identificato anche in altre specie batteriche tra cui *E. coli* e *Shigella flexneri* (54)

L'intensità di decarbossilazione dell'acido glutammico (attività-GAD) differisce da ceppo a ceppo, ed è correlata in modo diretto con la tolleranza ai succhi gastrici. (53)

Il sistema GAD della *L. monocytogenes* è costituito da tre decarbossilasi (GadD1, GadD2 e GadD3) e due proteine di trasporto (GadD1T1 e GadD2T2).

Il GadD1 facilita la crescita in ambienti lievemente acidi (pH 5.1), mentre la GadD2 interviene principalmente in condizioni più estreme come per esempio a pH 2.8.

Alcuni ceppi, tra cui tutti quelli non appartenenti ai sierotipi di gruppo 4, mancano dei geni che codificano la GadD1 e la proteina trasportatrice GadD1T1. Secondo Cotter e colleghi questo dato spiegherebbe parzialmente la maggiore frequenza di isolamento dei sierotipi 1/2 a, 1/2 b e 1/2 c dagli alimenti ed indica allo stesso tempo

che l'attività della GadD1 non è necessaria ai sierotipi 4 b per causare la listeriosi. (55)

Attraverso un test di tipo qualitativo, Olier ha rilevato una maggiore percentuale di ceppi con elevata capacità di decarbossilazione dell'acido glutammico a pH 4 tra i ceppi isolati dall'uomo (portatori sani e pazienti affetti da listeriosi) e da alcuni corvi rispetto a quelli provenienti dagli alimenti e dagli stabilimenti di lavorazione. (49)

Acido glutammico

L'acido glutammico è un amminoacido non essenziale che si può trovare in forma libera o legata. E' presente naturalmente in vari alimenti tra cui latte, formaggi e carni. Ed è spesso impiegato come additivo, generalmente sottoforma di sale sodico, come modificatore del sapore.⁶

Le quantità che si trovano normalmente nello yogurt, nella maionese o nel succo di arancia favoriscono in modo significativo la sopravvivenza dei ceppi di *L. monocytogenes* capaci di utilizzarlo rispetto a quelli che non riescono a metabolizzarlo.

Nella carne fresca l'acido glutammico prevale in forma legata; mentre il contenuto della forma libera, disponibile per i batteri, aumenta con i processi di fermentazione. (54) A titolo esemplificativo, durante la stagionatura l'acido glutammico nei prosciutti aumenta di centinaia di volte, passando da valori di circa 5.4 mg ogni 100g di muscolo fino a 415 ± 53 mg/100g dopo 13 mesi o addirittura a 658.9 ± 68.2 mg/100g dopo 18 mesi. (56)

⁶ L'acido glutammico e il GABA nell'uomo e negli animali sono dei neuro-trasmettitori con funzioni rispettivamente eccitatorie ed inibitorie. Inoltre, il primo è coinvolto anche in alcuni processi metabolici (come il trasporto attivo e transdesamminazione degli amminoacidi) dei vertebrati e si trova come costituente dell'acido folico. (57)

Inoltre, può essere importante rilevare che l'acido glutammico fa parte degli ingredienti con cui vengono formulati i mangimi per i suini.

***Listeria monocytogenes* al macello**

Autio e coll. hanno studiato le possibili modalità di diffusione delle listerie nelle carni di suino al macello.

Hanno preso in esame 50 carcasse, 250 corate, comprendenti lingua e tonsille, e 73 campioni ambientali in 10 macelli a capacità limitata. Le spugnature delle carcasse sono state effettuate subito dopo il sezionamento in mezzene.

Tipologia di campione	N.° campioni	N.° campioni positivi	% campioni positivi
Lingua	50	7	14
Tonsille	50	6	12
Cuore	50	3	6
Fegato	50	3	6
Reni	50	3	6
Carcasse	50	6	12
Utensili/Ambienti	73	5	7
Totali	373	33	9

Tabella 2: risultati ottenuti da Autio e coll. in 10 macelli a capacità limitata. Tabella modificata da Autio, 2000 (20).

Dopo aver analizzato i dati di prevalenza ottenuti nelle diverse tipologie di campioni (Tabella 2) e sottoposto a tipizzazione mediante PFGE i ceppi che sono riusciti ad isolare, concludono sottolineando come non sia ancora chiaro da dove provengano le listerie. Probabilmente, affermano, numerosi sono i ceppi di *L. monocytogenes* che entrano al macello con gli animali e successivamente alcuni di essi, grazie alle loro caratteristiche, sopravvivono, si adattano e colonizzano negli stabilimenti.

Ipotizzano in particolare che la lingua e le tonsille dei suini, essendo frequentemente contaminate (14-12%) rappresentino una delle principali vie per la diffusione di *L. monocytogenes*. Dalla lingua e dalle tonsille, attraverso la sega utilizzata per dividere le carcasse *L. monocytogenes* si diffonderebbe alle mezzene e quindi successivamente ai tagli di carne. Questa ultima affermazione è avvalorata dall'isolamento in alcuni casi degli stessi pulsotipi, trovati anche sulle corate, contemporaneamente su seghe per ossa e carcasse. (20)

Successivamente hanno ribadito l'importanza delle tonsille dei suini quale potenziale veicolo di *L. monocytogenes*. Infatti, con un altro studio, condotto questa volta presso 5 stabilimenti con una intensità di produzione tra i 400 e gli 800 suini/die, hanno trovato positive alla ricerca di *L. monocytogenes* il 14% delle tonsille da loro analizzate (valore simile a quello precedentemente riportato per i macelli a capacità limitata), e isolato 38 ceppi appartenenti a 24 pulsotipi differenti. (58)

Partendo dai risultati riportati da Autio e coll. (2000), Cantoni e coll. hanno sviluppato un progetto per valutare in particolare quali fossero

le fasi durante la macellazione dei suini in cui potesse essere presente *L. monocytogenes*.

Hanno quindi sottoposto ad analisi per ricerca di *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* alcune serie di campioni di campioni raccolti lungo la catena di produzione in un macello per suini.

In particolare hanno analizzato: feci (65), raschiati cutanei pre-scottatura (30) e post-scottatura (30), tonsille (30), tamponi ambientali di varia tipologia (64), prodotti finiti (34) e campioni di acqua, prelevati dalla vasca di scottatura e dai pozzetti di raccolta delle acque di lavaggio presenti nelle celle frigorifere

Il prelievo dei campioni ambientali è stato effettuato suddividendo la linea di produzione in 3 zone.

- Zona 1 o sudicia: in cui si svolgono le operazioni di abbattimento, dissanguamento, scottatura in vasca, depilazione e flambaggio.
- Zona 2: dove, dopo il trasferimento della carcassa su una guidovia diversa da quella utilizzata nella zona precedente, avvengono le operazioni di eviscerazione, sezionamento delle carcasse in mezzene e taglio della testa.
- Zona 3: dedicata al sezionamento delle mezzene in tagli, in cui si trovano essenzialmente oltre agli operatori, nastri trasportatori, tavoli ed utensili quali seghe e coltelli.

Seguendo una metodica che prevedeva due passaggi in brodo di arricchimento (48h a 37°C, ciascun) e la successiva semina in terreno selettivo e differenziale (Rapid L-mocytogenes) hanno rintracciato *L. monocytogenes* soltanto nelle tonsille (20%), sui ganci della linea per il trasporto dei visceri (18%) e nei golari (33%).

Pur ammettendo la possibilità di trovare *L. monocytogenes* nelle feci e sul mantello degli animali, non hanno isolato alcun ceppo né dalle

feci, né tanto meno dalle carcasse (in particolare da quelle le cui spugnature erano state effettuate prima del passaggio nella vasca di scottatura). Concludono che, relativamente allo stabilimento da loro considerato, l'entrata di *L. monocytogenes* è da imputare agli stessi suini. Inoltre, tonsille e golari rappresentano siti preferenziali di localizzazione per questo patogeno. (59)

In un altro lavoro, svolto prendendo in esame alcuni macelli a capacità limitata e locali per il sezionamento e la trasformazione delle carni, non hanno riscontrato significative differenze nelle percentuali di isolamento di *L. monocytogenes* in campioni di carne di specie diverse (bovini, suini, polli e tacchini).

Non hanno neppure trovato differenze tra campioni di carne e tamponi ambientali, dimostrando in tal modo l'ubiquitarietà di tale patogeno. (60)

Bonardi e Maggi nel 2002 hanno riportato i risultati di uno studio i cui intenti erano verificare la presenza delle listerie sulla cute e nelle feci dei suini al macello, nonché la loro eventuale persistenza lungo la catena di macellazione-sezionamento arrivando ai prodotti finiti. Trovano *L. monocytogenes* nelle feci dei suini a livelli di prevalenza simili a quelli riscontrati per i bovini e non escludono la possibilità di una contaminazione delle carcasse attraverso le feci, anche se tale evenienza appare loro modesta.

In particolare hanno isolato *L. monocytogenes* dalla cute di un gruppo di suini all'interno della stalla di sosta prima della docciatura pre-macellazione (2%); dalle feci (6%), dalla cute dopo il dissanguamento e dalla cotenna della zona dorsale di una mezzena sezionata (0.7%) di un altro gruppo di suini, seguiti dalla fase di stordimento fino a quella

di sezionamento delle carni.

Nello stesso studio non hanno invece riscontrato positività in tamponi effettuati sul pavimento della stalla di sosta, nel cosiddetto reparto pulito del macello (tavoli, coltelli, pareti delle celle frigorifere), in campioni d'acqua prelevati dalla vasca di scottatura e dalle carni (trito di spalla e di prosciutto, lombi, coppe e lingue) stoccate nelle celle frigorifere. (61)

Riportano anche più basse percentuali di positività rispetto a quelle precedentemente riportate (1.3% nelle feci e 0.7% sulle carcasse) dopo aver sottoposto a campionamento 150 suini di 150-180 kg di peso in due macelli dell'Emilia – Romagna. Sottolineano pertanto l'importanza delle procedure di GMP e soprattutto l'attenzione che deve essere rivolta alle fasi di eviscerazione, pulizia e disinfezione. I risultati di prevalenza ottenuti indicherebbero infatti una buona gestione dell'igiene negli impianti considerati. (62)

Con lo scopo di determinare la prevalenza di *L. monocytogenes* nei suini e provare a capire le modalità attraverso cui questo microrganismo patogeno si diffonde durante la macellazione, Kanuganti et al., hanno sottoposto a campionamento trecento suini sia in allevamento che durante la macellazione.

Hanno trovato *L. monocytogenes* in un campione (tampone) di tonsille (0.3%), prima della macellazione; nelle tonsille (7.1%), sulle carcasse (4.1%), nei linfonodi toracici (3.5%) e inguinali superficiali (1.9%), dopo l'eviscerazione. Sono invece risultati negativi i linfonodi ileo-ciecali e i campioni di materiale fecale.

Non considerano particolarmente attendibile il risultato ottenuto per le feci in quanto, a causa della pratica in uso nel macello esaminato di

svuotare l'intestino prima dell'eviscerazione, avrebbero avuto a disposizione quantità troppo piccole di materiale da analizzare. Ed ammettono che, in caso di rottura dell'intestino, le feci rappresentino una delle principali cause di contaminazione.

Concludono pertanto che la prevalenza di *L. monocytogenes* nei suini può essere stimata attraverso le positività riscontrate tra i campioni di feci, prima della macellazione, tonsille, spugnature di carcasse e linfonodi, al macello. Non spiegano la differenza di risultati per quanto riguarda le tonsille prima e dopo la macellazione

Interpretando inoltre i valori medi di prevalenza riscontrati al macello (di cui sopra), in 3 stabilimenti per la lavorazione delle carni di suino (50.2%) e nel macinato (92%), prelevato presso una macelleria, aggiungono che l'eventuale contaminazione delle carni suine con *L. monocytogenes* sarebbe più che altro un problema da correlare allo stoccaggio e non alle operazioni di macellazione e sezionamento, Infatti, essendo psicotrofa, durante lo stoccaggio a temperature di refrigerazione, *L. monocytogenes* può sopravvivere, ma soprattutto moltiplicarsi. (10)

Nesbakken et al. (1994) hanno cercato *L. monocytogenes* sulle carcasse di 240 suini macellati in 2 stabilimenti, uno in Svezia e l'altro in Norvegia.

Lo scopo del loro studio era verificare se avvolgendo l'intestino in un sacco di plastica al momento della sua estrazione dalla carcassa si potesse ottenere un riduzione dei livelli di contaminazione delle carni da *Yersinia enterocolitica* e *Listeria* spp..

Relativamente a *Yersinia enterocolitica* hanno avuto un riscontro positivo utilizzando il sacchetto di plastica: in un macello le carcasse

contaminate sono passate da 7 su 60 (11.2%) a 0 su 60 (0%); nell'altro da 5 su 60 (8.3%) a 1 su 60 (1.7%). Per quanto riguarda *L. monocytogenes* non hanno ottenuto invece alcun risultato interpretabile in quanto tutte le carcasse macellate, impacchettando l'intestino o meno, sono risultate essere non contaminate (0 su 240). Secondo loro questo dato si potrebbe spiegare con i bassi livelli di contaminazione delle feci dei suini già riportati da Skovgaard (1989) e Buncic (1991).

A titolo di curiosità, riscontrano invece una riduzione dal 33 al 10% dei livelli di contaminazione di *L. innocua* nel macello svedese: considerando le parti delle carcasse di cui erano rappresentativi i tamponi risultati positivi (regione sternale, zampe anteriori) rispetto a quelli negativi, ne deducono che *L. innocua* potrebbe anche avere un'origine non fecale.(63)

“Mentre per *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* la principale fonte di contaminazione delle carni al macello è rappresentata dagli stessi suini, non altrettanto si può dire per i generi *Listeria*. ed *Aeromonas* spp. e per *Staphylococcus aureus*”.

Secondo Borch, Nesbakken e Christensen (1996) la macellazione è un processo "aperto" in cui le listerie possono entrare attraverso varie vie. I suini e gli ambienti in cui le carni vengono lavorate fungono da serbatoi di listerie e le listerie possono essere endemiche all'interno degli stabilimenti. Come tali possono essere in parte controllate attraverso idonee procedure di pulizia e disinfezione, nonché utilizzate allo stesso tempo come indicatori di igiene.” (64)

Anche secondo Giovannacci et al. la contaminazione delle carcasse e delle carni suine con *L. monocytogenes* è causata dagli stessi suini e da inappropriate procedure di pulizia e disinfezione.

In contrasto con la teoria di Boerlin e Piffaretti, hanno isolato dei ceppi con genotipo simile in suini vivi, carni e superfici di lavoro all'interno di alcuni stabilimenti di macellazione-sezionamento, dimostrando in tal modo che i ceppi provenienti dagli animali non sempre differiscono da quelli che si trovano nei prodotti finali e negli ambienti di lavorazione.

Sarebbero comunque le procedure di pulizia e disinfezione, quando inappropriate, a produrre i danni maggiori. Infatti sottoponendo a tipizzazione (PFGE, RAPD e PCR-REA) i 289 da loro identificati, hanno rilevato che ad un unico genotipo appartenevano la maggior parte dei ceppi (64.08%), che agli stessi genotipi appartenevano ceppi isolati da più matrici (suini vivi, carni e campioni ambientali), ma soprattutto che agli stessi genotipi appartenevano anche ceppi isolati a distanza di un anno in due stabilimenti.

E' interessante notare che tra le positività dei campioni ambientali riportano anche quelle di pareti, ad altezze superiori ai due metri, soffitti, ventilatori e rotaie trasportatrici che raramente vengono sanificate e, aggiungiamo noi, sottoposte a campionamento. (24)

Secondo Buncic occorrerebbero dati in grado di chiarire quale tipo di relazione ci sia nei suini tra lo stato di portatore a livello faringeo e quello di eliminatore con le feci relativamente a *L. monocytogenes*.
Analizzando 97 campioni di materiale fecale e 103 tamponi eseguiti sulle tonsille di 200 suini differenti, riscontra infatti positività rispettivamente nel 3 e nel 46% dei campioni.

Campioni	Percentuali di positività	Paese	Reference
Carcasse	1/49 (2%)	Belgio	Korsak et al., (68)
	0/25 (0%)	Norvegia	Rørvik and Yndestad, (rip. Autio, 68)
	0/36 (0%)	Svizzera	Gobat and Jemmi, (rip. Autio, 68)
	4/90 (4%)	Olanda	Van den Elzen and Snijdres, (rip. Autio, 68)
	4/270 (1.7%) ¹	USA	Saide-Albornoz et al., (69)
	5/270 (1.9%)		
	5/270 (1.9%)		
	321/4330 (7.4%) ²	Giappone	Iida et al., (21)
	3/155 (1.9%)	Trinidad de Tobago	Adesiyun et al, (67)
	7/1038 (0.7%)	Taiwan	Yeh et al, (70)
	0/12 (0%)	Canada	Gill et Jones, (71)
	11/267 (4.1%)	USA	Kanuganti et al., (16)
	0/30 (0%) ³	Italia	Cantoni et al., (59)
	0/30 (0%)		
	0/120 (0%)	Svezia	Nesbakken et al., (63)
	0/120 (0%)	Norvegia	Nesbakken et al., (63)
	6/50 (12%)	Finlandia	Autio et al., (20)
	3/120 (2.5%)	Italia	Bonardi et al., (72)
	0/150 (0%)	Italia	Bonardi et al., (61)
	1/150 (0.7%)	Italia	Bonardi et al, (62)
Feci	74/250 ⁴	Giappone	Yokoyama et al., (73)
	46/5975 (0.8%) ²	Giappone	Iida et al., 1998 (21)
	3/172 (1.7%)	Danimarca	Skovgaard N, (rip. Boeileil, 15)
	2/34 (5.9%)	Germania	Weber A., 1995 (rip. Boeileil, 15)

¹ Stesse carcasse rispettivamente dopo scottatura, dopo l'ultimo lavaggio e all'interno della cella frigorifera dopo 18-24 ore dalla macellazione.

² Dati ottenuti con metodiche differenti.

³ Carcasse differenti, campionate prima e dopo il passaggio nella vasca di scottatura.

⁴ Risultato ottenuto aggiustando a 7.0 il pH del brodo di arricchimento.

	7/139 (5%) ⁵	Trinidad de Tobago	Adesiyun et al., (67)
	3/97 (3%)	Ex-Yugoslavia	Buncic et al., (65)
	0/255 (0%) ⁶	USA	Kanuganti et al., (16)
	0/65 (0%) ⁶	Italia	Cantoni et al., (59)
	7/120 (5.8%)	Italia	Bonardi et al., (72)
	3/50 (6%)	Italia	Bonardi et al., (61)
	2/150 (1.3%)	Italia	Bonardi et al., (62)
Tonsille			
	46/103 (45%)	Ex-Yugoslavia	Buncic et al., (65)
	(12%)	Finlandia	Autio et al, (20)
	38/271 (14%)	Finlandia	Autio et al, 2004
	6/30 (20%)	Italia	Cantoni et al, (59)
	18/252 (7.1%)	USA	Kanuganti et al., (16)

Tabella 3: Percentuali di prevalenza di *L. monocytogenes* in carcasce, feci e tonsille suine. Modificata da Autio 2003.

Riporta anche che il 61% dei suini alimentati con insilati risultava portatore a livello faringeo di *L. monocytogenes*, contro il 29% di quelli alimentati soltanto con mangimi secchi.

Pertanto ipotizza che sia nei suini che nei bovini, *L. monocytogenes* arrivi attraverso i mangimi contaminati a colonizzare i tessuti linfatici della regione della gola. Le percentuali di rinvenimento nelle feci sarebbero invece influenzate dai bassi livelli di contaminazione iniziale e dalla conseguente ridotta probabilità per i ceppi di passare indenni attraverso l'apparato gastroenterico, nonché dall'azione competitiva di *L. innocua*. (65)

Thevenot e coll. sono gli Autori di una recente review, in cui sono discusse le principali cause della presenza di *L. monocytogenes* nella

⁵ Tamponi rettali con isolamento a freddo e semina dopo 1, 3 e 6 settimane.

⁶ Due arricchimenti e poi isolamento con un solo terreno differenziale.

filiera suina, con particolare riferimento alle carni e agli stabilimenti in cui queste vengono lavorate e trasformate.

Allo stato attuale delle conoscenze, *L. monocytogenes* risulterebbe una specie che dai suini (feci, mantello, lingua, tonsille) può essere veicolata ai prodotti carnei e derivati e che può sopravvivere e moltiplicarsi negli ambienti di produzione, in quanto psicrofila, capace di formare biofilms e in alcuni casi di resistere ai disinfettanti.

Il rischio di trasmissione tra materie prime, utensili ed operatori è “continuo” ed è pertanto inevitabile il suo isolamento nell'industria delle carni.

Per limitare tale rischio sottolineano l'importanza delle operazioni di pulizia e disinfezione, della corretta applicazione dei piani di autocontrollo, nonché delle Good hygiene practices (GHP) e delle Good manufacturing practices (GMP). (14)

Un importante contributo, direttamente dal “campo”, viene dato da Leoni e coll. che riportano i risultati delle attività di ispezione per conto dell' Azienda Sanitaria locale della Provincia di Bergamo in 40 macelli a capacità limitata.

Si soffermano in particolare sui risultati inerenti la presenza/assenza di *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. in tamponi ottenuti da pareti, attrezzature, abiti da lavoro e carcasse di animali. E richiamano l'attenzione del lettore sulle condizioni di gestione dei macelli.

Nello specifico, *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. entrerebbero al macello con gli animali, ma anche attraverso gli operatori, in particolare quando questi non sono stati adeguatamente informati dei rischi sanitari.

La mancata comprensione dei concetti di igiene, pulizia e disinfezione da parte degli operatori rappresenterebbero infatti secondo loro la causa principale dell' inquinamento delle carni con queste specie batteriche.

Inoltre, le due positività riscontrate su 536 campioni totali, una per *Salmonella* spp. e l'altra per *L. monocytogenes*, ovvero il mancato ritrovamento in quasi tutti i campioni testati delle specie patogene ricercate, non rifletterebero per forza di cose una condizione di assenza di patogeni.

Infatti considerando le condizioni di scarsa igiene che si possono riscontrare talvolta e soprattutto nei macelli a capacità limitata, condizioni in parte giustificate dalle carenze strutturali e dalle difficoltà economiche degli stessi stabilimenti, i risultati ottenuti farebbero pensare, piuttosto, ad un'elevata carica batterica: tale addirittura da ostacolare l'isolamento di *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp.. (66)

Adesiyun e Krishnan hanno trovato *L. monocytogenes* nelle feci e nelle carcasse dei suini al macello: con una percentuale superiore nelle feci, ma non significativamente differente rispetto a quella riportata per le carcasse. I campioni da loro analizzati provenivano da suini differenti. Le feci sono state campionate mediante tamponi rettali eseguiti subito prima della macellazione.

I risultati dei campioni fecali sono stati positivi quattro volte su sei, in due di queste anche le carcasse sono risultate contaminate.

Nove isolati su 10 di *L. monocytogenes* appartenevano al sierotipo 4, l'unico appartenente al gruppo 1 dei sierotipi proveniva dalle feci. Pertanto concludono che la presenza di *L. monocytogenes* nelle feci

dei suini rappresenta una fonte di pericolo per la successiva contaminazione delle carcasse. (67)

Materiali e metodi

Campionamento macelli

Con lo scopo di verificare il grado di contaminazione da *Listeria monocytogenes* nei suini, tra ottobre 2003 e novembre 2004 sono stati sottoposti a campionamento sei stabilimenti (di seguito riportati con numero progressivo da 1 a 6) ad alta capacità produttiva e autorizzati ad esportare negli Stati Uniti.

Ad ogni visita i prelievi sono stati eseguiti quando era trascorsa almeno mezzora dall'inizio delle operazioni di macellazione.

Complessivamente sono state analizzate 373 carcasse e 278 campioni di feci di suini (Tabella 4).

Le carcasse sono state campionate con metodo non-distruttivo mediante spugne disidratate(35X75mm-Sponge-Bag PBI®), inumidite con soluzione salina isotonica (fosfato di Butterfield). Considerando una sola mezzena per ciascuna carcassa, le spugne sono state strofinate nelle regioni del torace, della coscia e del guanciaie.

Il prelievo, rappresentativo di circa di 300cm², è stato effettuato alla fine delle operazioni di macellazione e bollatura.

Per il campionamento delle feci sono stati prelevati segmenti di colon da, cui venivano estratti fino a 25 g di materiale fecale presso il laboratorio.

I campioni, trasportati all'interno di frigoriferi a temperatura controllata ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$) sono stati analizzati entro le 24 ore successive all'arrivo in laboratorio.

Macelli	Tamponi	Feci	N.° di campionamenti
Macello 1	64	53	8
Macello 2	63	41	11
Macello 3	39	28	6
Macello 4	70	53	11
Macello 5	68	53	11
Macello 6	69	50	10
Totali	373	278	57

Tabella 4: dettaglio dei campioni analizzati.

Come procedure di laboratorio sono state seguite le metodiche ISO 11290 parte 1 e 2, rispettivamente per ricerca e conta di *L. monocytogenes*. (30, 35)

Sinteticamente, l'ISO 11290 parte 1 (ricerca) consiste di due passaggi in brodo di arricchimento (half-Fraser broth e Fraser broth) del campione da testare e la successiva semina da ciascuno di essi nei terreni selettivi Oxford agar e Palcam agar. L'ISO 11290 parte 2 (conta) prevede invece l'inoculazione del campione, previamente diluito utilizzando il brodo half-Fraser, direttamente in Palcam agar, dopo un breve periodo di incubazione a 20°C .

Per l'identificazione di genere e specie, le colonie risultate β -emolitiche, in Columbia blood agar (Oxoid) addizionato con il 5% di sangue di pecora, sono state successivamente sottoposte alla

colorazione di Gram, al test della catalasi, alle prove di fermentazione di D-xilosio e L-ramnosio e al CAMP-test.

Un ceppo di ciascun campione risultato positivo è stato sierotipizzato con l'antisiero (Denka Seiken, Tokyo, Japan) secondo le istruzioni del produttore

Durante il progetto sono stati impegnati nei prelievi tre persone che si alternavano nelle diverse giornate, a due a due. In occasione di ogni visita le coppie hanno provveduto anche a misurare la temperatura della vasca di scottatura.

Eventuali analogie e differenze dei risultati ottenuti sono state verificate mediante il test del χ^2 e il test t di Student. (74)

Test della glutammasi

Seguendo le indicazioni di Olier e coll. (2004) (48), abbiamo provato a sottoporre al test della glutammasi i ceppi isolati nel corso del campionamento assieme ad altri ceppi provenienti da carcasse e feci suine, nonché alcuni ceppi isolati da un salume, simile ad un insaccato a breve stagionatura, costituito da carne di pecora.

Per la preparazione del brodo sono state seguite le indicazioni di Olier e riportando solo alcune modifiche: 200ml di acqua deionizzata sterile, 18g di NaCl, 0.2 g di acido glutammico, 0.01 g di verde di bromocresolo addizionati con acido cloridrico (HCl) fino a raggiungere il pH desiderato (4.00) e successivamente Triton-X-100 per far diventare il brodo di colore giallo senza modificarne il pH.

I ceppi da sottoporre alla prova sono stati inoculati in Brain Heart Infusion (BHI broth – Oxoid) e incubati a 37°C per una notte. Un ml del brodo di coltura è stato prelevato, inoculato in provette da centrifuga e sottoposto a centrifugazione (6000rpm per 15'). Estratto il

surnattante, il pellet ottenuto è stato lavato in 1 ml di soluzione fisiologica (0.9%), sottoposto nuovamente a centrifugazione e sospeso in 0.5 ml del brodo contenente acido glutammico.

Incubati a 37°C, dopo 4 ore i campioni sono stati sottoposti a lettura come indicato da Olier: colore giallo del brodo utilizzato per il test: assenza di attività glutammasica; verde chiaro presenza di bassa attività glutammasica; azzurro-celeste indice di alta attività glutammasica.

Per ciascun ceppo dei 37 ceppi testati la prova è stata ripetuta 3 volte, utilizzando tre differenti soluzioni per il test .

I ceppi 23, 24 e 25 provengono dallo stesso campione di feci di suino e sono stati isolati dopo il primo arricchimento (half- Fraser, 24 ore 30°C): il 23 e il 24 su Palcam agar base e il 25 su Oxford agar base.

Il ceppo 27 è stato isolato su Palcam agar base dopo il primo arricchimento (half-Fraser, 24 ore 30°C).

Resistenza alla bile

I ceppi sottoposti alla prova della glutammasi sono stati sottoposti anche ad un test per verificarne la resistenza alla bile. Dopo incubazione per una notte in BHI agar a 37°C, sono stati seminati in BHI agar addizionato con l'1% di bile ed incubati a 37°C per 48 ore. Sono state eseguite quattro prove: due con bile suina estratta direttamente dalla cistifellea e due utilizzando un estratto di bile (Porcine bile extract – Sigma).

Tabella 5: dettaglio dei ceppi impiegati per il test della glutammasi e la prova di resistenza alla bile.

Campione	Sierotipo	Provenienza	Campione	Siererotipo	Provenienza
Ceppo 1	1/2 b	Carcassa suina	Ceppo 20	1/2 b	Carcassa suina
Ceppo 2	1/2 b	Feci di suino	Ceppo 21	1/2 c	Carcassa suina
Ceppo 3	1/2 a	Feci di suino	Ceppo 22		ATCC
Ceppo 4	1/2 c	Feci di suino	Ceppo 23		Feci di suino
Ceppo 5		Feci di suino	Ceppo 24		Feci di suino
Ceppo 6		Feci di suino	Ceppo 25		Feci di suino
Ceppo 7		Feci di suino	Ceppo 26	1/2 a	Carcassa suina
Ceppo 8	1/2 b	Carcassa suina	Ceppo 27		Pitina
Ceppo 9	1/2 b	Carcassa suina	Ceppo 28		Pitina
Ceppo 10	1/2 c	Carcassa suina	Ceppo 29		Pitina
Ceppo 11	1/2 c	Carcassa suina	Ceppo 30		Pitina
Ceppo 12	1/2 a	Carcassa suina	Ceppo 31		Pitina
Ceppo 13	1/2 b	Carcassa suina	Ceppo 32		Pitina
Ceppo 14	1/2 a	Carcassa suina	Ceppo 33		Pitina
Ceppo 15	1/2 c	Carcassa suina	Ceppo 34		Pitina
Ceppo 16	1/2 c	Carcassa suina	Ceppo 35		Pitina
Ceppo 17	1/2 b	Carcassa suina	Ceppo 36		Pitina
Ceppo 18	1/2 c	Carcassa suina	Ceppo 37		Pitina
Ceppo 19	1/2 b	Carcassa suina			

Risultati

Carcasse e feci

Tra le carcasse suine campionate 10 sono risultate positive per ricerca di *L. monocytogenes* (ISO 11290 – parte 1). Nessuna ha evidenziato livelli di contaminazione pari o superiori al limite inferiore previsto per la conta. (ISO 11290 – parte 2). Le positività hanno coinvolto 4 stabilimenti su 6, con percentuali variabili tra lo 0 e il 6.3%. (Tabella 6).

Macelli	N.° carcasse positive	N.° carcasse negative	N.° carcasse totali	Percentuale dei positivi
Macello 1	3	61	64	4.7%
Macello 2	4	59	63	6.3%
Macello 3	1	38	39	2.6%
Macello 4	2	68	70	2.9%
Macello 5	0	68	68	0%
Macello 6	0	69	69	0%
Totali	10	363	373	2.7%

Tabella 6: Campionamento delle carcasse suine per ricerca e conta di *L. monocytogenes*: i risultati sono suddivisi per macelli.

Da un solo campione di feci è stata isolata *L. monocytogenes*: il campione è stato prelevato nello stabilimento 4 e in quella occasione le spugnature delle carcasse analizzate (5) sono state tutte negative.

Complessivamente, è stata trovata *L. monocytogenes* nel 2.7 % delle carcasse suine e nello 0.4% dei campioni di materiale fecale.

Le percentuali delle positività riportate per singoli macelli non differiscono tra loro in modo significativo (test del χ^2).

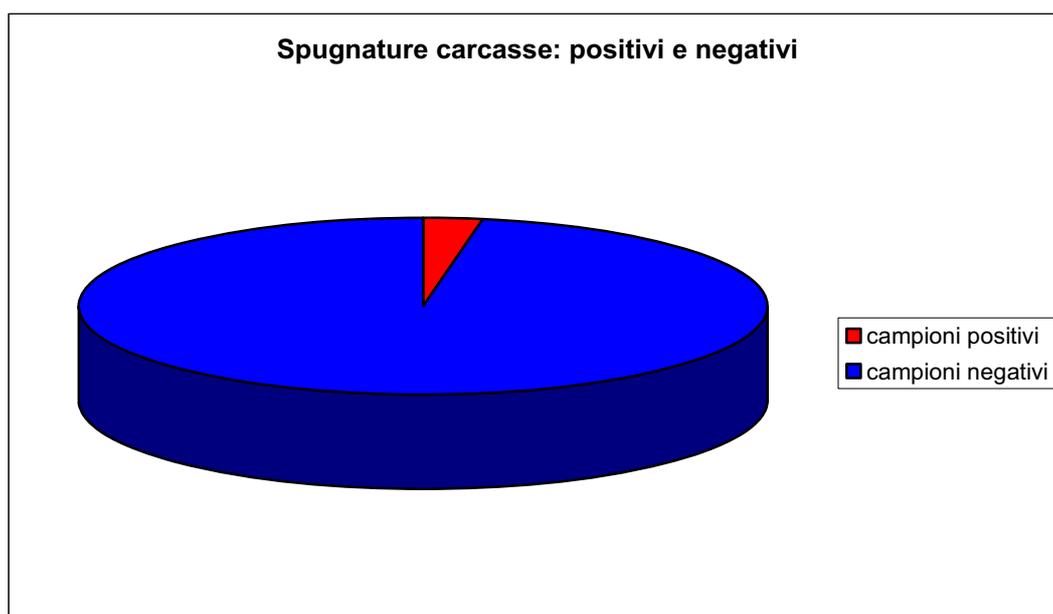


Figura 1: Confronto tra le percentuali dei campioni negativi rispetto ai positivi.

Ceppi isolati

Sono stati isolati 87 ceppi β -emolitici di *L. monocytogenes* di cui 47 da Oxford e 40 da Palcam. Soltanto in due occasioni è risultato determinante l'utilizzo di uno dei due terreni: una volta l'Oxford e l'altra il Palcam.

Macelli	Sierotipi
Macello 1	1/2 c, 1/2 b, 1/2 a
Macello 2	1/2 c, 1/2 b, 1/2 b, 1/2 c
Macello 3	1/2 c
Macello 4	1/2 b, 1/2 a

Tabella 7: sierotipi identificati suddivisi per macelli

I sierotipi identificati appartenevano ai gruppi 1/2 a (1), 1/2 b (4) e 1/2 c (4): il dettaglio è riportato in Tabella 7.

Temperatura dell'acqua nelle vasche di scottatura

In occasione di ogni visita agli stabilimenti di macellazione è stata verificata la temperatura dell'acqua all'interno della vasca di scottatura (tabella 8).

Macelli	N.° campionamenti	T° vasca di scottatura
Macello 1	8	62(7), 63(1)
Macello 2	11	63(6), 64(1), 65(3), 68(1)
Macello 3	6	62(6)
Macello 4	11	61(2), 62(5), 63(1), 64(2), 65(1)
Macello 5	11	60(1), 61(8), 62(2)
Macello 6	10	60(1), 61(5), 62(4)
Totali	57	60(2), 61(15), 62(24), 63(8), 64(3), 65(4), 68(1)

Tabella 8: misure della temperatura dell'acqua nelle vasche di scottatura.

La distribuzione delle misure ottenute segue un andamento pressoché gaussiano; fanno eccezione i due valori più alti (65, 68) che si possono considerare come casi sporadici al di fuori dell'area sottostante la curva dell'intervallo a cui viene normalmente mantenuta la temperatura dell'acqua (Figura 2).

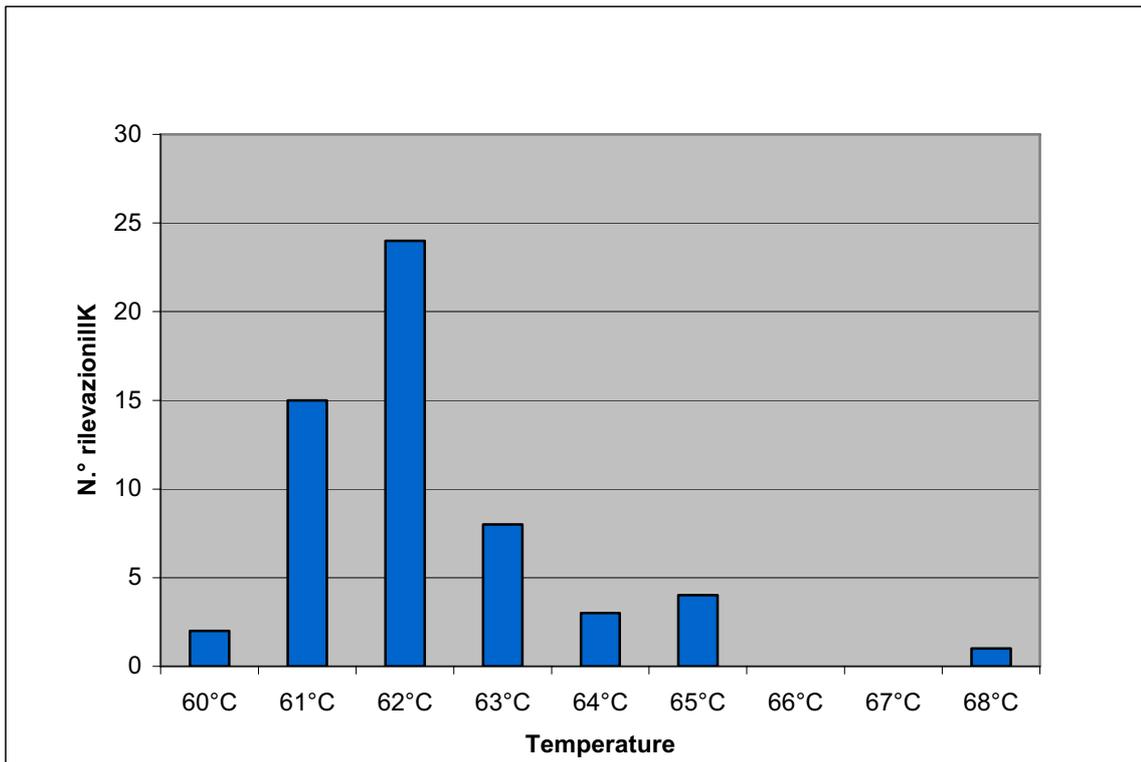


Figura 2: temperatura dell'acqua nelle vasche di scottatura: dati complessivi di tutti i macelli.

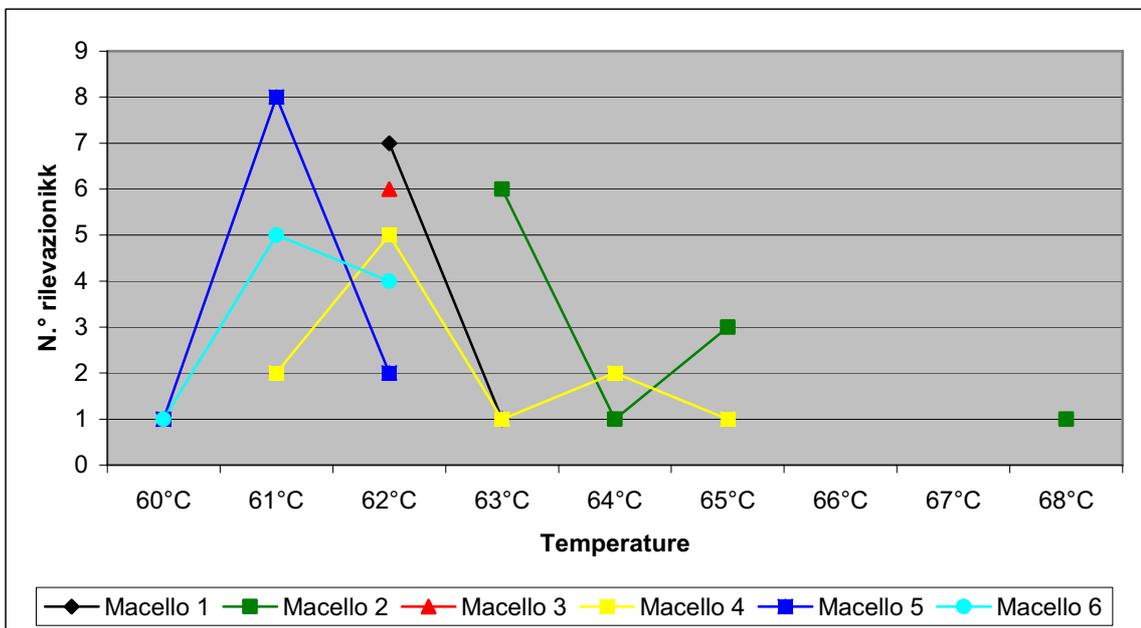


Figura 3: temperatura dell'acqua nelle vasche di scottatura: dettaglio dei singoli macelli.

Presso il Macello 2 è stato registrato il valore medio più alto di temperatura (64.09). Dallo stesso stabilimento sono state riportate anche un maggiore numero di positività, in valore assoluto e relativo, rispetto agli altri macelli.

Escludendo i dati del Macello 2, la media delle temperature registrate quando le carcasse sono risultate tutte negative (61.72) è stata inaspettatamente più bassa rispetto alla media delle misure relative al riscontro delle positività (62.16). Confrontandoli mediante il test t di Student è possibile verificare che questi due valori non differiscono tra loro in modo significativo ($t = 1.0696$).

Macelli	N.° campioni positivi	T° vasca di scottatura
Macello 1	3	62, 62, 62
Macello 2	4	68, 65, 65, 63
Macello 3	1	62
Macello 4	2	64, 61
Totali	10	61(1), 62(4), 63(1), 64(1), 65(2), 68(1)

Tabella 9: temperature dell'acqua delle vasche di scottatura in occasione dell'isolamento di *L. monocytogenes* dalle carcasse suine.

I tamponi delle carcasse, prelevati nei differenti macelli, sono stati suddivisi in base ai giorni della settimana lavorativa (Tabella 10). Complessivamente, confrontando tra loro il numero dei campioni positivi, rispetto ai negativi, non si riscontrano differenze tra il lunedì e il resto della settimana. ($P = 0.09$).

	Mac. 1	Mac.2	Mac. 3	Mac. 4	Mac. 5	Mac. 6	Totali
Lunedì	6	6		20(1)	25	13	70(1)
Martedì	48(3)	23(2)	27	30(1)	26	29	183(6)
Mercoledì	10	29(1)	12(1)	20	17	20	108(2)
Giovedì		5(1)					5(1)
Venerdì						7	7
Totali	64	63	39	70	68	69	373

Tabella 10: totale tamponi analizzati/(positività), suddivisi in base ai giorni lavorativi della settimana in cui sono stati eseguiti i prelievi.

Risultati del test della glutammasi

I dettagli delle prove effettuate per verificare l'attività glutammasica sono riportati nelle Tabella 11. Tutti i ceppi testati hanno evidenziato un'alta attività-GAD a pH 4.

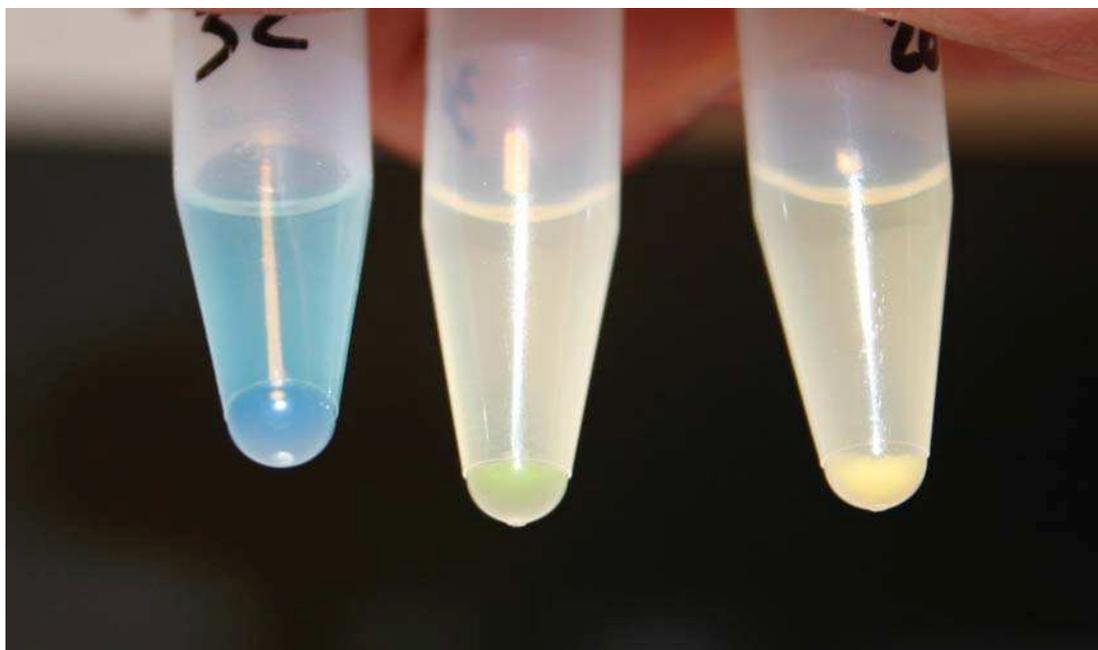


Figura 4: Test della glutammasi.

Dopo aver constatato che la maggior parte dei ceppi mostravano un'elevata capacità di decarbossilazione dell'acido glutammico a pH 4, abbiamo ripetuto il test utilizzando un brodo il cui pH era stato aggiustato a 2.5. Lo scopo era quello di verificare se fosse stato possibile discriminare ulteriormente tra loro i ceppi. A pH 2.5 nessuno dei ceppi selezionati ha mostrato però una reazione anche solo debolmente positiva, neppure quelli isolati dall'insaccato stagionato: probabilmente a causa dello stress troppo intenso.

Tabella 11: riassunto risultati attività-GAD

	pH 4.0	pH 3.5	pH 2.5		pH 4.0	pH 3.5	pH 2.5
Ceppo 1	alta	bassa	nulla	Ceppo 20	alta	Bassa	nulla
Ceppo 2	alta	bassa	nulla	Ceppo 21	alta	Bassa	nulla
Ceppo 3	alta	bassa	nulla	Ceppo 22	alta	Bassa	nulla
Ceppo 4	alta	bassa	nulla	Ceppo 23	nulla	Bassa	nulla
Ceppo 5	alta	bassa	nulla	Ceppo 24	nulla	Bassa	nulla
Ceppo 6	alta	bassa	nulla	Ceppo 25	alta	Bassa	nulla
Ceppo 7	alta	bassa	nulla	Ceppo 26	alta	Bassa	nulla
Ceppo 8	alta	bassa	nulla	Ceppo 27	alta	Alta	nulla
Ceppo 9	alta	bassa	nulla	Ceppo 28	alta	Bassa	nulla
Ceppo 10	alta	bassa	nulla	Ceppo 29	alta	Bassa	nulla
Ceppo 11	alta	bassa	nulla	Ceppo 30	alta	Bassa	nulla
Ceppo 12	alta	bassa	nulla	Ceppo 31	alta	Bassa	nulla
Ceppo 13	nulla	bassa	nulla	Ceppo 32	alta	Bassa	nulla
Ceppo 14	alta	bassa	nulla	Ceppo 33	alta	Bassa	nulla
Ceppo 15	alta	bassa	nulla	Ceppo 34	alta	Bassa	nulla
Ceppo 16	alta	bassa	nulla	Ceppo 35	alta	Bassa	nulla
Ceppo 17	alta	bassa	nulla	Ceppo 36	alta	Bassa	nulla
Ceppo 18	alta	bassa	nulla	Ceppo 37	alta	Bassa	nulla
Ceppo 19	alta	bassa	nulla				

Considerando che l'esito del test a pH 2.5 poteva essere stato influenzato anche dalla concentrazione dell'acido glutammico (54) abbiamo ripetuto la prova raddoppiando la concentrazione di

quest'ultimo, portando il pH della soluzione per il test a pH 3.5. Il risultato (Tabella 11) è stato che tutti i ceppi in questo caso hanno evidenziato un basso grado di attività-GAD.

Nel complesso, fatta eccezione per i ceppi 13, 23, 24 e 27 tutti i ceppi hanno mostrato alta attività-GAD a pH 4, bassa a pH 3.5, nulla a pH 2.5. I ceppi 13, 23 e 24 hanno presentato attività-GAD nulla a pH 4, il 27, alta con pH 3.5.

Risultati prova di resistenza alla bile

Riguardo alle prove di resistenza alla bile e della capacità di idrolizzare i sali biliari (Attività BSH-asica), è stato scelto di effettuare soltanto la prima, in quanto rispetto agli scopi che ci eravamo prefissati, abbiamo ritenuto che potesse darci informazioni più complete sul comportamento delle colonie. Comunque, tutti i ceppi eccetto uno, proveniente da una carcassa, si sono mostrati in grado di crescere in BHI addizionato con l'1% di bile.

Discussione

La macellazione è un processo complesso in cui, accanto ad una serie di operazioni - stordimento, iugulazione, depilazione, eviscerazione, sezionamento delle carcasse in mezzene, ispezione sanitaria, lavaggio finale - che devono essere eseguite in rapida successione, ci sono numerosi punti critici. Soltanto alcuni di questi sono punti critici di controllo (CCP)⁷ propriamente detti, pertanto la macellazione rappresenta un processo aperto in cui il rischio di contaminazione in effetti è continuo. (22, 64, 75)

Se alcuni Autori ipotizzano che la presenza di *L. monocytogenes* nelle carni di suino al macello, e in particolare sulle carcasse, sia un problema principalmente di natura ambientale (14, 21) altri hanno rilevato che le percentuali di detenzione sulle carcasse, aumentano con l'eviscerazione (76) o rimangono costanti prima e dopo il sezionamento in mezzene. (59, 69).

I dati riportati in bibliografia indicano che analizzando le tonsille, la lingua o i golari dei suini al macello, si ottengono percentuali di isolamento di *L. monocytogenes* simili (20) o più alte (16, 59) rispetto a quelle derivanti dalle carcasse e dalle feci.

⁷ CCP, riferito al metodo di analisi HACCP, è l'acronimo di Critical Control Point e letteralmente significa: "punti decisivi/efficaci nel tenere sottocontrollo."

L'eviscerazione rappresenta quindi uno dei momenti più critici della catena di macellazione e per avere un'idea dell'igiene del processo è necessario verificare le contaminazioni delle carcasse alla fine della macellazione. Per valutare anche l'importanza della contaminazione fecale è stato deciso di campionare le feci.

Le percentuali trovate nelle feci e nelle carcasse sono state rispettivamente pari a 0.4 e 2.7%. Dai dati riportati in bibliografia si evince che *L. monocytogenes* si trova nelle carcasse dei suini con percentuali variabili tra lo 0 e il 12%. In alcuni campionamenti in cui è mancato il riscontro di positività il numero dei campioni considerati è piuttosto contenuto per cui risulta difficile una comparazione. I risultati di Nesbakken, 1994 (0 su 120) e Bonardi, 1997 (0 su 150) rispetto a quello trovato (10 su 373), non differiscono invece in modo significativo ($P=2.07$, $P=2,79$), così come non ci sono differenze il nostro risultato e quelli riportati dagli altri Autori (vd. Tabella 3)

I livelli di contaminazione riscontrati sulle carcasse fanno pensare a buoni livelli di igiene dei macelli coinvolti nel campionamento, anche in considerazione del fatto che nessuna delle positività riscontrate ha raggiunto il limite inferiore previsto dalla metodica utilizzata per la "conta".

I differenti valori percentuali ottenuti potrebbero dipendere dalle modalità di svolgimento della macellazione all'interno degli stabilimenti presi in esame. (69). Comunque valori così bassi dovrebbero garantire riguardo all'efficacia dei piani di autocontrollo, ma soprattutto della corretta applicazione delle Buone Pratiche di Lavorazione (GMP).

Per valutare le eventuali fluttuazioni causate dalla ripresa dei lavori, e quindi conseguenti a differenti condizioni di pulizia dei macelli, (69)

abbiamo provato a confrontare i risultati ottenuti utilizzando come riferimento il rapporto tra positività, numero di campioni prelevati e i giorni della settimana in cui sono stati effettuati i prelievi. Probabilmente si tratta di dati questi che potrebbero essere valutati anche per singoli macelli, comunque complessivamente possiamo dire che: “non sono state trovate differenze tra il numero di volte in cui un campione è risultato positivo il lunedì rispetto agli altri giorni della settimana”.

Il dato della temperatura dell’acqua delle vasche di scottatura è un dato indicativo, in quanto la temperatura dell’acqua subisce delle inevitabili variazioni durante il corso della giornata lavorativa. La misurazione ripetuta più volte a distanza di tempo, ovvero in occasione di ogni giornata di campionamento, è però utile per valutare i valori medi. I dati che sono stati registrati indicano che di solito nei macelli presi a campionamento, l’acqua è mantenuta a circa 62°C: una temperatura ottimale, in considerazione anche della successiva fase di depilazione. (75)

Il dato relativo al Macello 2, ovvero al macello in cui sono state registrate le temperature più alte e un numero maggiore di positività, potrebbe essere stato dovuto ad un malfunzionamento del sistema di riscaldamento della vasca o del sistema di rilevazione della temperatura, per cui non è possibile trarne delle conclusioni. Se però il dato fosse confermato, sarebbe interessante, in quanto indicherebbe che il mantenimento dell’acqua a temperature più alte rispetto a quelle normalmente consigliate non garantisce comunque dell’assenza di *L. monocytogenes*. In questo caso, il riscontro delle positività potrebbe essere correlato ad un tentativo di riduzione del tempo di passaggio

delle carcasse nella vasca di scottatura e/o alle conseguenze del restringimento dei pori piliferi. (75)

Per quanto riguarda la percentuale di positività dei campioni di materiale fecale (0.4%), possiamo soltanto notare che rientra nell'ampia variabilità dei risultati presenti in letteratura: si va dallo 0 al 16% fino addirittura al 50% (15,77). A spiegare una tale eterogeneità concorrono vari fattori, tra cui il tipo di alimento che viene dato ai suini (secco/umido), (15, 65) la modalità del campionamento e la procedura utilizzata in laboratorio.

Secondo Boeleil in realtà il problema è che manca una metodica specifica per l'isolamento di *L. monocytogenes* da campioni altamente contaminati come sono le feci. (15) Per altri Autori la procedura che fornisce i risultati più attendibili è quella che prevede l'incubazione a freddo, che però richiede tempi lunghi. (11, 78) In effetti Adesiyun (1995) ha riportato una percentuale di positività pari al 5% seguendo la tecnica dell'arricchimento a freddo e seminando su terreno selettivo i campioni dopo 1, 3 e 6 settimane. (67) D'altro canto un risultato simile, anzi più alto, (5.8%) è stato ottenuto anche da Bonardi (2006) che però ha utilizzato il metodo USDA/FSIS MLG 8.03 che non prevede un periodo di incubazione a temperature di refrigerazione. (72) Se si considera il numero di specie batteriche presenti nell'apparato gastroenterico e l'azione inibitoria di alcune di esse nei confronti di *L. monocytogenes*, come ad esempio i lattobacilli, sorge il dubbio che non si tratti di un problema di metodica adeguata, ma che forse sia la stessa *L. monocytogenes* che non resiste nelle feci. Coniugando forse questi due pensieri, Yokoyama (2005), ha trovato *L. monocytogenes* in 74 campioni di feci di suini su 100, aggiustando

il pH del brodo di arricchimento (pH=7) onde evitare una eccessiva acidificazione dello stesso. (73)

Le basse percentuali di positività trovate nelle carcasse fanno pensare che siano stati i suini a portare *L. monocytogenes* nel macello.

Non è stato però possibile stabilire se responsabili della contaminazione delle carcasse siano state le feci, la cute o le tonsille. Il fatto che non siano state riscontrate differenze tra i ceppi delle carcasse con quelli delle feci, potrebbe significare che, se gli uni non derivano dagli altri, almeno tutti hanno un'origine comune. Rimane la considerazione che i ceppi suini e quelli isolati dalle pitine sono apparsi simili.

Relativamente al discorso della persistenza nelle carni di *L. monocytogenes* durante le fasi successive alla macellazione, come abbiamo detto nell'introduzione ci sono due teorie opposte: una ammette che i ceppi provenienti dai macelli possano inquinare anche i prodotti finali, (24) l'altra al contrario sottolinea maggiormente l'importanza di altre fonti di contaminazione ed è basata principalmente sul riscontro dell'isolamento di pulsotipi differenti tra materie prime e prodotti finali.

I risultati dell'attività glutammica indicano che, in riferimento agli stress esercitati (pH 3.5 – 4.0; NaCl 9%), i ceppi che abbiamo isolato dalle carcasse possono resistere nelle carni in seguito ai naturali processi di fermentazione, in quanto accanto alla riduzione del pH si ha anche l'aumento della concentrazione di acido glutammico libero. (56) La constatazione che gli stessi ceppi siano inattivati ad un valore di pH simile a quello che si trova in condizioni normali nello stomaco dell'uomo, fa però ipotizzare che siano necessarie dosi infettanti elevate affinché possano risultare patogeni per l'uomo. (79)

Contrariamente a quanto riportato ad Olier e coll., tutti i ceppi che provenivano dalle carcasse hanno mostrato un'attività glutammasica elevata a pH 4.0. La spiegazione di tale differenza non sembrano riconducibili alle modifiche apportate alla preparazione della soluzione per il test. A parziale conferma dei nostri risultati c'è anche uno studio di Dykes e Moorhead (2000) che, confrontando l'acido resistenza di alcuni isolati clinici umani e di altri presi dalle carni, hanno rilevato che ventotto ceppi su trenta avevano un comportamento simile: soltanto due su quindici, isolati dalla carne, erano più acido sensibili. (80)

Conclusioni

I livelli di contaminazione, la sporadicità degli isolamenti e la constatazione che non c'è stato un incremento delle percentuali di detenzione rispetto ai dati riportati in letteratura, indicano che il rischio di eventuali contaminazioni delle carni in uscita dai macelli considerati è ridotto.

Comunque, in relazione al pH, i ceppi che sono stati isolati possono persistere nelle carni nelle fasi successive alla macellazione, anche in seguito a periodi di stagionatura, rappresentando quindi un pericolo per il consumatore.

Bibliografia

- 1) Notermans S., Food Poisonings Outbreaks, 1999, in Encyclopaedia of Food Microbiology, edited by R.K. Robinson, C.A. Batt, P.D. Patel, Academic Press, 2000, Vol. 2, 835-840
- 2) Manuale Merck, quarta edizione, traduzione del Merck Manual of Diagnosis and Therapy – Seventeenth Edition, Beers M.H., Berkow R. editors, Medicom Italia, Milano, 2001
- 3) de Valk H., Jacquet C., Goulet V., Vaillant V., Perra A., Simon F., Desenclos JC, Martin P., Surveillance of *Listeria* infections in Europe, Eurosurveillance, 2005, Vol.10, Issues 10-12, 2005, 251-255
- 4) Rizzo Caterina, Luzzi Ida, Caprioli Alfredo, Ciofi degli Atti Marta Luisa, Disamina dei dati nazionali disponibili in materia di zoonosi, con particolare attenzione ai focolai di tossinfezione alimentare (TA), (http://www.epicentro.iss.it/temi/veterinaria/pdf/zoonosi_tossinf.pdf)
- 5) Bianucci F., Legnani P.P., Igiene degli alimenti, le tossinfezioni alimentari, in Elementi di Igiene e Medicina Preventiva, terza edizione, Esculapio Bologna, 1998, 357-358

6) Serraino A., Poda G., Sanguinetti V., Bucci Sabattini M.A., Ricci B., Alberghini L., Rosmini R., Presenza di *Listeria* spp. in uno stabilimento di produzione di salsiccia fresca: considerazioni igienico-ispettive, Atti Sisvet, 1999, Vol.LIII, 327-328

7) European Food Safety Authority (EFSA), The Community Summary Report of Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005, The EFSA Journal (2006), 94 (<http://www.efsa.europa.eu/it.html>)

8) Rocourt J., Cossart P., *Listeria monocytogenes*, in Food Microbiology Fundamentals and Frontiers, edited by Doyle M.B., Beuchat L.R., Montville T.J., ASM Press, Washington D.C., 1997, 337-352

9) Direttiva 2003/99 CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003, sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la direttiva 92/117/CEE del Consiglio, Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 12/12/2003, Serie L, 325/331

10) Decreto Legislativo 4 aprile 2006, n. 191, "Attuazione della direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti di zoonotici", Gazzetta Ufficiale n. 119, 24 maggio 2006

11) European Food Safety Authority (EFSA), The Community Summary Report of Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic

Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union in 2004, The EFSA Journal, (2005), 310 (<http://www.efsa.europa.eu/it.html>)

12) La Placa, *Listeria monocytogenes*, in Principi di Microbiologia medica – Ottava Edizione, Società Editrice Esculapio, Bologna, 2000, pagg. 250-252

13) Organisation Mondiale de la Santé Animal (OIE), *Listeria monocytogenes*, Chapter 2.10.14, in Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2004 (http://www.oie.int/fr/normes/nmanual/a_summry.htm)

14) Thévenot D., Dernburg A., Vernozy-Rozand C., An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products – Review article, Journal of Applied Microbiology, 2006, 101, 7-17

15) Belcœil P-A., Chauvin C., Toquin M.-T., Fablet C., Le Nôtre Y., Salvat G., Madec F., Fravallo P., *Listeria monocytogenes* contamination of finishing pigs: an exploratory epidemiological survey in France, Veterinary Research, 2003, 34, 737-748

16) Kanuganti S.R., Wesley I.V., Gopal Reddy P., McKean J., Hurd H.S., Detection of *Listeria monocytogenes* in Pigs and Pork, Journal of Food Protection, 2002, 65, 1470-1474

- 17) Peccio A., Autio T., Korkeala H., Rosmini R., Trevisani M., *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants, *Letters in Applied Microbiology*, 2003, 37, 234-238
- 18) Thévenot D., Delignette-Muller M.L., Christieans S., Vernozy-Rozand C., Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products, *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 102, 85-94
- 19) Reij M.W., Den Aantrekker E.D., ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force, Recontamination as a source of pathogens in processed foods, *International Journal of Food Microbiology*, 2004, Vol. 91 (1), 1-11
- 20) Autio T., Säteri T, Fredriksson M., Rahkio M.,Lunden J, Korkeala H., *Listeria monocytogenes* Contamination Pattern in Pig Slaughterhouses, *Journal of Food Protection*, 63, 10, 2000, 1438-1442
- 21) Iida T., Kanzaki M., Nakama A., Kokubo Y., Maruyama T., Kaneuchi C., Detection of *Listeria monocytogenes* in Humans, Animals and Foods, *J. Vet. Med. Sci.*, 1998, 60 (12), 1341-1343
- 22) Nesbakken T., Kapperud G., Caugant D.A., Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry, *International Journal of Food Microbiology*, 31, 1996, 161-171

- 23) Nesbakken T., Skjerve E., Interruption of Microbial Cycles in Farm Animals from Farm to Table, *Meat Science*, 1996, 43, N.° S, 1996, S47-S57
- 24) Giovannacci I., Ragimbeau C., Queguiner S., Salvat G., Vendevre J.-L., Carlier V., Ermel G., *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology, *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 53, 127-140
- 25) Dussurget O., Pizzarro-Cerda J., Cossart P., Molecular Determinants of *Listeria monocytogenes* virulence, *Annual Review of Microbiology*, 2004, 58, 587-610
- 26) Gahan C.G.M., Hill C., Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection, A Review, *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98, 1345-1353
- 27) Bergey's Manual of Systematic bacteriology, Vol. 1: The Archea and the deeply branching and phototropic bacteria, Boone D.R., Castenholz R.W. editors, New York Springer, 2001
- 28) Poli G., Cocilova A., *Microbiologia e immunologia veterinaria*, UTET Torino, 2001, 261-262
- 29) Poli G., Cocuzza G., Nicoletti G., Clementi M., *Microbiologia medica*, UTET, Torino, 2002

30) International Standard - ISO 11290-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method, First edition 15-12-1996

31) Donnelly C.W., *Listeria monocytogenes*, Cap.8 in Foodborne Disease Handbook, Diseases Caused by Bacteria, Vol. 1, edited By Y. H. Hui, J. Richard Gorham, K. D. Murrell, Dean O. Cliver, Marcel Dekker, Inc., 1994, 215-252

32) International Commission on Microbiological Specifications for foods (ICMSF), Microorganisms in Food 5, Microbiological Specifications of food pathogens, Chap.8, *Listeria monocytogenes*, London, Blakie Academic & Professional, 141-182

33) Perrin M., Bemer M., Delamare C., Fatal case of *Listeria innocua* Bacteremia, Journal of Clinical Microbiology, 2003, Vol. 41, No 11, 5308-5309

34) Gualandi G., *Listeria*, Cap.22, in Trattato di Malattie Infettive degli animali – seconda edizione, a cura di Renato Farina, Franco Scamozza, UTET, 2004, Torino, 285-293

35) International Standard - ISO 11290-2, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Enumeration method, First edition 01-07-1998

36) Cantoni C., Intossicazioni e tossinfezioni alimentari – *Listeria monocytogenes*, in Kramer J., Cantoni C., Alimenti: Microbiologia e Igiene, 2^a edizione, OEMF, Milano, 49-53

37) Walker T. S., *Listeria monocytogenes* in Batteri zoonotici Cap. 10, Microbiologia, EDISES, 2001, 206-210

38) Donnelly G.W., Brackett R.E., Doores S., Lee W.H., Lovett J., *Listeria*, in Compendium of methods for the microbiological examination of foods, Third Edition, Edited By Vanderzant C and Splittstoesser D. F., American Public Health Association, 1992, 637-663

39) Koch J, Stark, Significant increase of listeriosis in Germany – Epidemiological patterns 2001-2005, Surveillance report, Eurosurveillance monthly releases, Vol. 11, Issue 6, 2006 (<http://www.eurosurveillance.org/>)

40) Ministero della Salute, Dati del bollettino epidemiologico in linea, (<http://www.ministerosalute.it/promozione/malattie/datidefcons.jsp>)

41) Istituto Superiore di Sanità – EpiCentro, Argomenti di Salute, *Listeria*, (<http://www.epicentro.iss.it/problemi/listeria/listeria.htm>)

42) Centers for Disease Control and Prevention: Morbidity and Mortality Weekly Report, Preliminary Foodnet Data on the Incidence of Infection With Pathogens Transmitted Commonly Through Food-

10 States, United States, 2005, Journal of the American Medical Association, Vol. 295, N°.19, May 17, 2006 (on line: <http://www.jama.ama-assu.org/cgi/content/full/295/19/2241>)

43) Southwick F.S., Purich D.L., Intracellular pathogenesis of listeriosis, The New England Journal of Medicine, 1996, Vol. 334, No. 12, 770-776

44) Vázquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal, Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J., *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants Clinical Microbiology Reviews, 2001, Vol. 14, No. 3, 584-640

45) Bortolami R., Callegari E., Beghelli V., Anatomia e fisiologia degli animali domestici, Edagricole, Bologna, 1985, 274

46) Begley M., Gahan C.G.M., Hill C., The interaction between bacteria and bile, FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29, 625-651

47) Begley M., Gahan C.G.M., Hill C., Bile Stress Response in *Listeria monocytogenes* L028: Adaptation, Cross-Protection, and Identification of Genetic Loci Involved in Bile Resistance, Applied and Environmental Microbiology, 2002, 6005-6012

48) Ridlon J.M., Kang D.-J., Hylemon P.B., Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria – review, Journal of Lipid research, 2006, Vol. 47, 241-259

49) Olier M., Rousseaux S., Piveteau P., Lemaître J.-P., Rousset A., Guzzo J., Screening of glutamate decarboxylase activity and bile salt resistance of human asymptomatic carriage, clinical, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes*, International Journal of Food Microbiology, 2004, 93, 87-99

50) Dussrget O., Cabanes D., Dehoux P., Lecuit M., Buchrieser C., Glaser P., Cossart P., *Listeria monocytogenes* bile salt Hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis, Molecular Microbiology, 2002, 45 (4), 1095-1106

51) Begley M., Sleator R.D., Gahan C.G.M., Hill C., Contribution of Three Bile-Associated Loci, *bsh*, *pva* and *btlB*, to Gastrointestinal Persistence and Bile Tolerance of *Listeria monocytogenes*, Infection and Immunity, 2005, 73, 2, 894-904

52) Gandhi M., Chikindas M.L., *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive, International Journal of Food Microbiology, 2007, 113, 1, 1-15

53) Cotter P.D. Gahan C.G.M., Hill C., A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid, Molecular microbiology, 2001, 40, 2, 465-475

54) Cotter P.D., O'Reilly K., Hill C., Role of the Glutamate Decarboxylase Acid Resistance System in the Survival of *Listeria*

monocytogenes L028 in Low pH Foods, Journal of Food Protection, 2001, 64, 9, 1362-1368

55) Cotter P.D., Ryan S., Gahan C.G.M., Hill C., Presence of GadD1 Glutamate Decarboxylase in Selected *Listeria monocytogenes* Strains Is Associated with an ability To Grow at Low pH, Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71, 6, 2832-2839

56) Strata A., Il Prosciutto di Parma “Rivistato” nel 2002 – I contenuti Bromatologici e gli Aspetti Nutrizionali. (<http://www.prosciuttodiparma.com>)

57) Viviani R., Elementi di Biochimica, Tomo secondo, Nutrizione e metabolismo degli animali, UTET Torino, 1985

58) Autio T., Markkula A., Hellström S., Niskanen T., Lunden J., Korkeala H., Prevalence and Genetic Diversity of *Listeria monocytogenes* in the Tonsils of Pigs, Journal of Food Protection, 2004, 67, 4, 805-808

59) Cantoni C., Arcidiacono M., Stella S., Localizzazione di *Listeria monocytogenes* in macelli per suini, Industrie Alimentari, XLI, 2002, 17-24

60) Ripamonti B., Zecchini A., Colombo F., Stella S., Cantoni C., Localizzazione di *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. nei macelli, Ingegneria Alimentare, 3 (gennaio), 2002, 7-13

- 61) Bonardi S., Bottarelli A., Bentley S., Gorreri M., Torriani M., Maggi E., Ricerca di *Listeria* spp. in uno stabilimento di macellazione di suini pesanti, Atti VII Convegno Nazionale AIVI , 1997, 163-167
- 62) Bonardi S., Brindani F., Maggi E., Isolation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. from pigs at slaughter in Italy, Ann. Fac. Medic.Vet. di Parma, 2002, XXII, 205-210
- 63) Nesbakken T., Nerbrink E., Røtterud O.J., Borch E., Reduction of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria* spp. On pig carcasses by enclosure of the rectum during slaughter, International Journal of Food Microbiology, 1994, 23, 197-208
- 64) Borch.E., Nesbakken T., Christensen H., Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria, International Journal of Food Microbiology, 1996, 30, 9-25
- 65) Buncic S., The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia, International Journal of Food Microbiology, 1991, 12, 173-180
- 66) Leoni.S, Moriggi F., Ferrari G., Ricerca di *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* in macelli di capacità limitata, Industrie Alimentari, XLIV (maggio), 2005, 495-501
- 67) Adesiyun A.A., Krishnan C., Occurrence of *Yersinia enterocolitica* O:3, *Listeria monocytogenes* O: 4 and termophilic

Campylobacter spp. in slaughter pigs and carcasses in Trinidad, Food Microbiology, 1995, 12, 99-107

68) Autio T., Tracing the sources of *Listeria monocytogenes* contamination and listeriosis using molecular tools - Academic Dissertation, Department of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland, 2003, 1-67

69) Saide-Albornoz J.J., Linn Knipe C., Murano E.A., Beran G.W., Contamination of Pork Carcasses during Slaughter, Fabrication, and Chilled Storage, Journal of Food Protection, 1995, 58, 9, 993-997

70) Yeh K-S., Chen S-P, Lin J-H., One-Year (2003) Nationwide Pork Carcass Microbiological Baseline Data Survey in Taiwan, Journal of Food Protection, 2005, 68, 3, 458-461

71) Gill C. O., Jones T., The presence of *Aeromonas*, *Listeria* and *Yersinia* in carcass processing equipment at two pig slaughtering plants, Food Microbiology, 1995, 12, 135-141

72) Bonardi S., Bacci C., Salsi A., Cavallini P., Brindani F., Applicazione delle metodiche analitiche USDA/FSIS alla ricerca di *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* in suini macellati in Emilia Romagna, Atti XVI Convegno Nazionale AIVI, 2006, 42-26

73) Yokoyama E., Saitoh T., Maruyama S., Katsube Y., The marked increase of *Listeria monocytogenes* isolation from contents of swine

cecum, *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 2005, 28, 259-268

74) Cavalli Sforza L., *Analisi statistica per medici e biologi – Serie di biologia*, Bollati Boringhieri, Torino, 1965

75) Giuseppina Marilia Tantillo, *La produzione igienica della carne*, Edagricole, Bologna, 2001

76) dos Santos L.A.G., Pinto P.S.A, Moraes M.P., Vanetti M.C.D., Bevilacqua P.D., Pinto M.S., Dias F.S., *Detecção de *Listeria monocytogenes* como subsídio à determinação de pontos críticos de contore no abate de suínos*, *Bioscience Journal*, Uberlândia, 2005, 21 (2), 131-135

77) Belœil P-A., Fravallo P., Chauvin C., Fablet C., Salvat G., Madec, *Listeria spp. Contamination in Piggeries: Comparison of Three Sites of Environmental Swabbing for Detection and Risk Factor Hypothesis*, *Journal of Veterinary Medicine series B*, 2003, 50, 155-160

78) Erdogan H.M., Cripps P.J., Morgan K.L., *Optimization of a Culture Technique for the Isolation of *Listeria monocytogenes* from Faecal Samples*, *Journal of Veterinary Medicine series B*, 2002, 49, 502-506

79) Koutsoumanis K.P., Sofos J.N., *Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and a_w limits for growth of *Listeria**

monocytogenes, International Journal of Food Microbiology, 2005, 104, 83-91

80) Dykes G.A., Moorhead S.M., Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin, International Journal of Food Microbiology, 2000, 56, 161-166

Indice

Introduzione	1
<i>Listeria monocytogenes</i> e listeriosi	6
<i>Listeria monocytogenes</i>	6
listeriosi	8
Meccanismi di resistenza dell'ospite	13
Bile	13
Attività BSH-asica	14
Sistema della glutammato decarbossilasi	15
Acido glutammico	17
<i>Listeria monocytogenes</i> al macello	19
Materiali e metodi	32
Campionamento macelli	32
Test della glutammasi	34
Resistenza alla bile	35
Risultati	37
Carcasse e feci	37
Ceppi isolati	38
Temperatura dell'acqua nelle vasche di scottatura	39
Risultati del test della glutammasi	42
Risultati prova di resistenza alla bile	44
Discussione	45
Conclusioni	51
Bibliografia	52