



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

CORSO DI LAUREA

Scienze Biologiche

Listeria monocytogenes negli alimenti e ambienti di lavorazione

Listeria monocytogenes in foods and in food-processing environments

Tesi di laurea
di:

Sara Laghetti

Docente referente

Chiar.mo Prof:

Francesca Biavasco

Sessione: Straordinaria – Febbraio

Anno Accademico: 2018-2019

Listeria monocytogenes:

- Batterio gram positivo;
- Può diffondersi negli ambienti di lavorazione e negli alimenti stessi;
- Agente eziologico della listeriosi, potenzialmente fatale in bambini, anziani, donne in gravidanza, soggetti immunodepressi;
- Importante problema degli alimenti RTE (Ready to Eat);



Focolai di listeriosi: due o più persone si ammalano in seguito all'ingestione di alimenti con stessa origine (carne e pesce poco cotti, vegetali crudi non lavati, formaggio, latte...)

Nel 2015 in Italia sono verificati 12 casi di listeriosi e 2 decessi causate dal batterio presente in carne di maiale.

Campionamento ed analisi del campione:

- Le aree di possibile contaminazione sono: scarichi, pavimenti, aree umide, angoli...
- Metodo di analisi: esame colturale che prevede l'arricchimento del campione (brodo di Fraser) e la coltivazione su terreni selettivi (Listeria Agar, ALOA Agar);
- Esistono anche metodi di analisi molecolari ed immunologici.

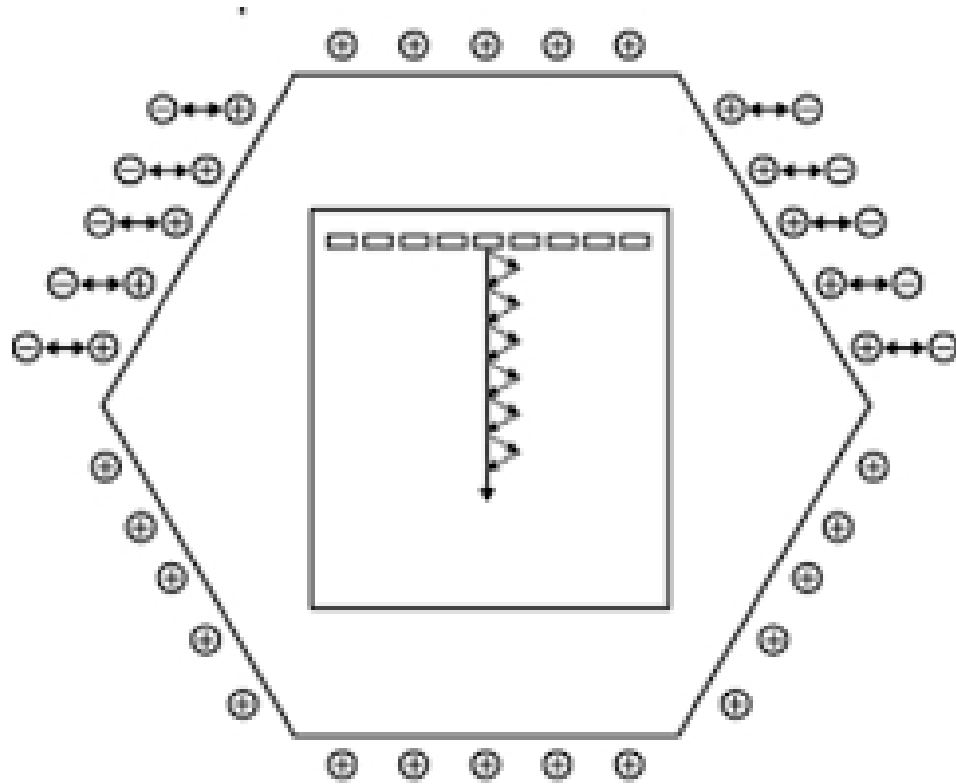
Caratterizzazione degli isolati:

- **Sierotipizzazione** → 13 sierotipi di cui 1/2a, 1/2b e 4b causano la listeriosi;
- **Ribotipizzazione** → ibridazione dei frammenti di DNA ottenuti con sonde di rRNA 16s e 23s;
- **MLST** (*Tipizzazione di Sequenze in diversi loci*) → in base alle sequenze presenti a livello di 7 geni housekeeping viene definito il 'tipo allelico' o tipo di sequenza (ST). Questo è possibile utilizzando cgMLST → MLST sul genoma core (80%); wgMLST → su tutto il genoma attraverso il **WGS**;
- **PFGE** (*Elettroforesi su Gel a Campo Pulsato*) → grazie al campo pulsato si ottiene una sorta di 'impronta' attraverso cui si determina il *pulsotipo*.

Con queste tecniche si realizzano dendrogrammi e si raggruppano gli isolati in CC (Complessi Clonali).

Interpretazione dei risultati della PFGE:

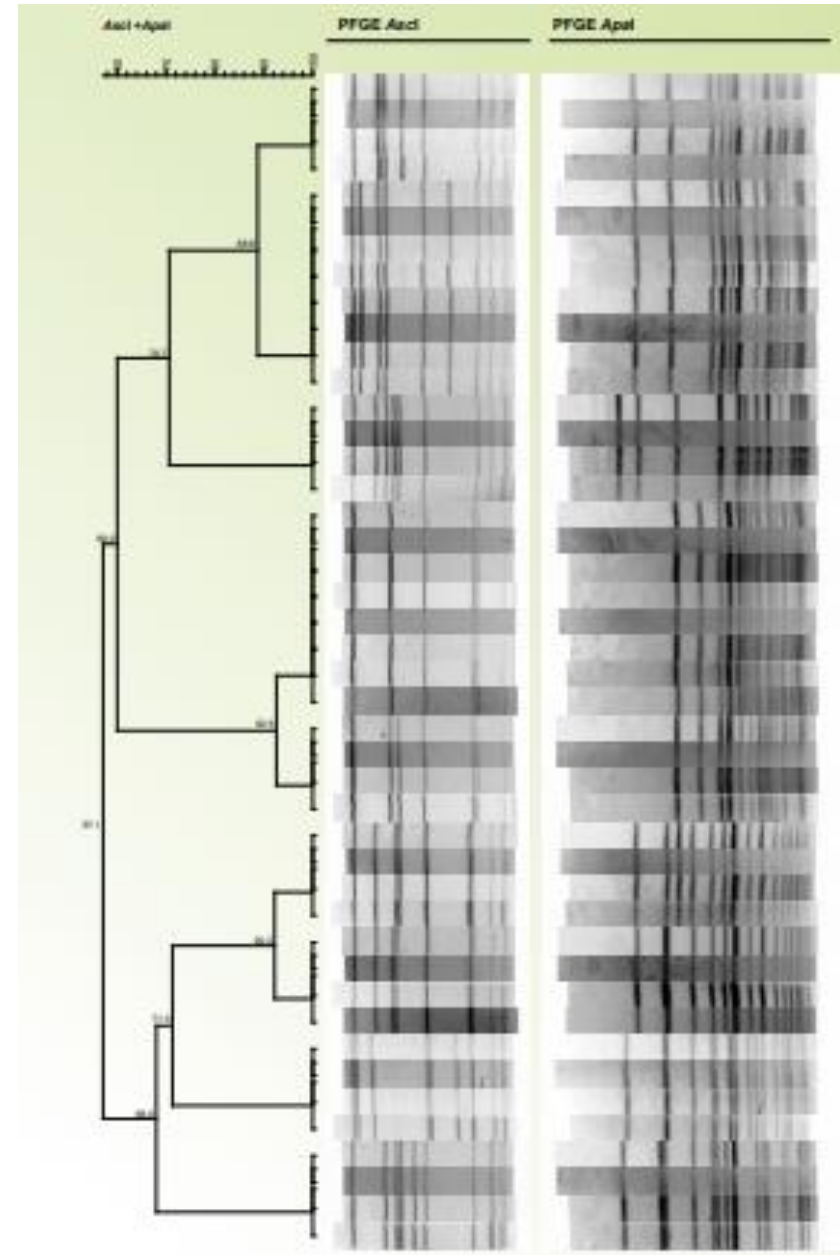
a.



a. Elettroforesi su gel a campo pulsato

b. Dendrogramma

b.



Persistenza negli ambienti di lavorazione:

Isolamento ripetuto dello stesso pulso tipo dallo stesso ambiente per più di 6 mesi.

Le cause della persistenza risiedono nei geni che codificano per la resistenza ad alcuni disinfettanti (gene **qacH**, **SSI**) e per la produzione di biofilm.

Presenza a livello di vendita al dettaglio:

Ultimo passo prima che il prodotto raggiunga il consumatore. Nel 2010-2011 sono stati campionati nell'UE varie tipologie di alimenti a rischio di contaminazione in 26 Stati Membri:

- **Pesce** confezionato (non congelato), affumicato a freddo o marinato;
- Prodotti a base di **carne**;
- **Formaggi** a pasta molle o semi molle.

Risultati:

Prevalenza della presenza di *L. monocytogenes* per il 10,3% nel pesce, 2,07% nella carne e 0,47% nel formaggio.

Campioni superiori al **limite di 100 UFC/g** di alimento a ridosso della data di scadenza: 1,7% nel pesce, 0,43% nella carne e 0,06% nel formaggio.



Uno studio condotto nel 2010 stimò che l'83% dei casi di listeriosi e decessi attribuiti ai salumi sono dovuti a prodotti venduti al dettaglio.

Regolamento C.E. n° 2073/2005 sulla presenza di *L. monocytogenes* negli alimenti RTE:

- Assenza del batterio in 10 campioni da 25 g per alimenti destinati a bambini;
- < 100 UFC/g (5 x 25g) negli alimenti che non supportano la crescita microbica, durante tutta la durata di conservazione;
- Assenza (5 x 25g) negli alimenti che supportano la crescita microbica nel momento in cui l'alimento lascia l'impianto di produzione. Poi < 100 UFC/g per tutta la durata di conservazione.

Determinazione della capacità dell'alimento di sostenere la crescita microbica:

Sopravvivenza e crescita dipendono da:

- Fattori intrinseci (pH e aw): la crescita microbica non è supportata, indicativamente, con i seguenti valori di **pH** $\leq 4,4$ e **Aw** (attività dell'acqua) $\leq 0,92$.
- Fattori estrinseci (umidità, temperatura di conservazione, materiale da imballaggio...)

Nel caso di *L. monocytogenes* è in grado di riprodursi anche a temperature di refrigerazione (0-4°C) e fino a 45°C e ad elevate concentrazioni saline (> 10%).

Challenge studies → studi che prevedono di inoculare deliberatamente l'alimento. Devono essere effettuati per ogni nuova formulazione alimentare.

Questi fattori ci permettono di dimostrare il potenziale di crescita (con incremento del logaritmo della O.D. $\geq 0,5$ durante il 1° giorno).

Successivamente si può calcolare il tasso di crescita specifico (μ) e di conseguenza il tempo di generazione (**G**), che fornisce un valore in unità di tempo. In questo modo si può verificare se la carica batterica supererà il limite di 100 UFC/g entro il periodo di scadenza.

Nuovi metodi di controllo di *L. monocytogenes*:

Batteriofagi come nuovi agenti di controllo:

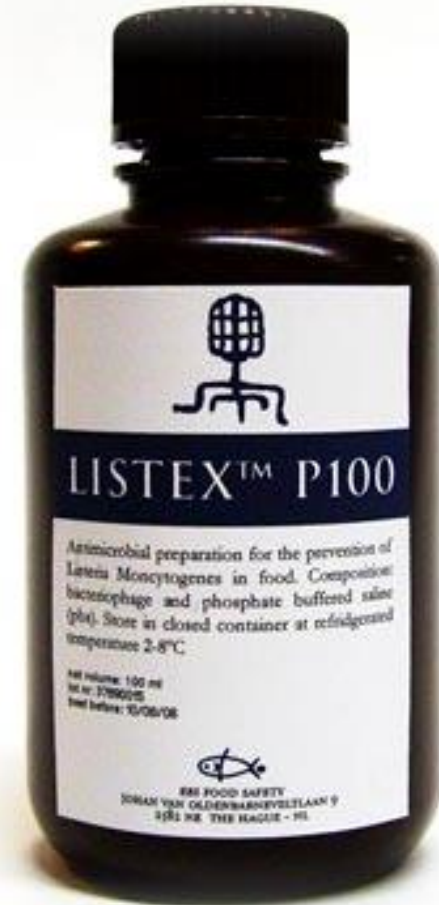
- Viene sfruttata la specificità d'ospite;
- Autoreplicanti, semplici da usare e poco costosi da produrre;
- Si possono utilizzare anche endolisine fagiche purificate.

Cocktails di fagi vivi approvati dalla F.D.E. (Food and Drug Administration):

LMP-102 per il controllo di *L. monocytogenes* su carne rossa e pollame;

Listex P100 per il controllo su prodotti RTE a base di carne e formaggio.

La quantità di fagi necessaria di solito è intorno a 10^8 UFP/g.



Batteriocine come nuovi agenti di controllo:

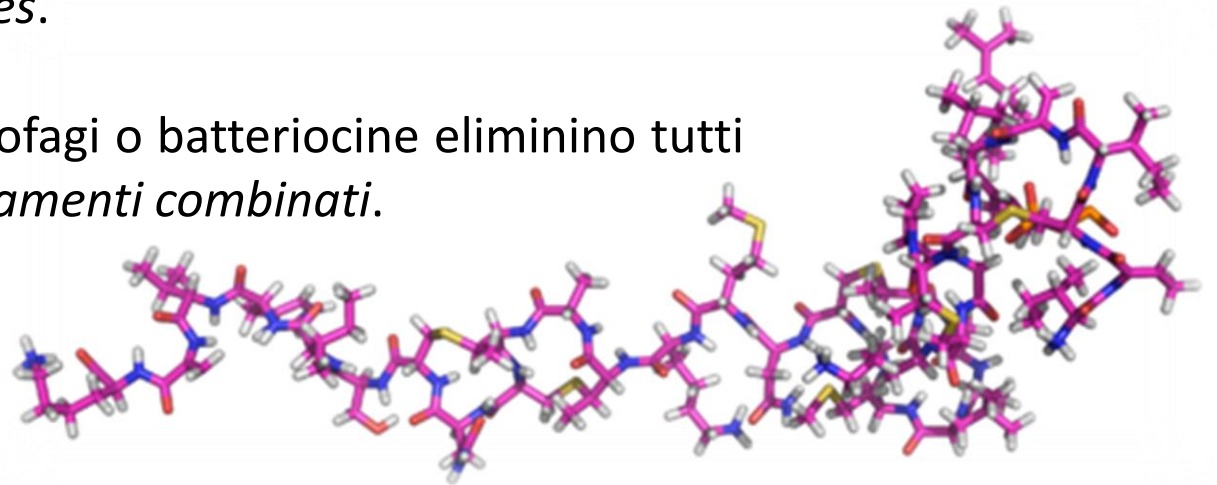
Peptidi o proteine prodotte da alcuni batteri e che ne inibiscono altri, creando un poro nella membrana cellulare. Vantaggi:

- Sono prodotte da organismi che colonizzano alimenti;
- Dimostrata attività contro batteri patogeni e decompositori;
- Stabili a variazioni di calore e pH.

Nisina I → approvata dall'O.M.S. come conservante di prodotti latteo-caseari;

Pediocina PA-1 → efficace contro *L. monocytogenes*.

È improbabile che i singoli trattamenti con batteriofagi o batteriocine eliminino tutti i problemi di sicurezza, perciò si usano anche *trattamenti combinati*.



Conclusioni:

Data la sua diffusione e la sua capacità di contaminare gli alimenti e ambienti di lavorazione e di causare malattie potenzialmente fatali, *Listeria monocytogenes* rappresenta una vera e propria minaccia per la salute pubblica.

I metodi sperimentati con l'utilizzo di batteriofagi e batteriocine come conservanti ed agenti di controllo, oltre ad essere importanti nel controllo della listeriosi, risultano essere positivi poiché sono naturali, e non vanno ad intaccare la qualità degli alimenti.

Questi metodi risultano particolarmente importanti per le aziende produttrici di alimenti in quanto consentono di ridurre la perdita economica dovuta al deterioramento degli alimenti, che costituisce un problema per molte delle industrie alimentari.

Grazie per l'attenzione...

Sintesi: *Listeria monocytogenes* è un batterio molto diffuso in natura, e proprio per questo può diffondersi anche negli ambienti di lavorazione alimentare e quindi negli stessi alimenti. Rappresenta un pericolo per la salute pubblica, perché la sua ingestione tramite cibo contaminato può causare una malattia potenzialmente fatale: la listeriosi. Per questo motivo è importante il controllo del batterio soprattutto nella vendita al dettaglio e negli alimenti RTE (ready to eat) poiché prima del consumo non c'è alcun passaggio antimicrobico. La sua caratterizzazione, in seguito a campionamento e coltivazione su terreni selettivi, viene effettuata tramite tecniche come MLST o PFGE.

La crescita e sopravvivenza del batterio dipendono da diversi fattori intrinseci ed estrinseci all'alimento; inoltre, nel caso di *Listeria monocytogenes* i parametri di sopravvivenza sono molto ampi: si riproduce anche alle temperature di refrigerazione (0-4 °C) e ad elevate salinità.

Per prevedere se il numero di batteri supererà il limite imposto dai Regolamenti Europei (100 UFC/g) entro la data di scadenza, vengono fatti dei "challenge studies" ovvero studi in cui il cibo viene direttamente inoculato con il batterio e viene valutato il relativo potenziale di crescita, tasso di crescita specifico e quindi il tempo di generazione.

Esistono nuovi metodi per il controllo di *L.monocytogenes*:

- Utilizzo di batteriofagi: virus di batteri, viene sfruttata la loro specificità d'ospite e l'efficacia delle endolisine fagiche contro i batteri gram positivi come in questo caso;
- Utilizzo di batteriocine: proteine batteriche in grado di inibire altri batteri agendo sulla membrana cellulare. Solitamente vengono usati trattamenti combinati poiché esistono dei ceppi altamente tolleranti.