

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
CAMPUS DI CESENA  
SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA  
CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN  
TECNOLOGIE ALIMENTARI

***LISTERIA MONOCYTOGENES* NEI FORMAGGI:  
ELEMENTI DI VALUTAZIONE DEL RISCHIO  
PER I CONSUMATORI VULNERABILI**

Tesi in:

69154 - Ispezione ed igiene degli alimenti di origine animale  
(Biologia dei microrganismi ed ispezione degli alimenti (C.I.))

Relatore:

**Prof.ssa Alessandra De Cesare**

Presentata da:

**Solidea Amadei**

Matricola N° 831163

Anno accademico 2019/2020

Sessione unica

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>3</b>
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	3
1.1.1 Sintomatologia ed incidenza della listeriosi.....	5
1.1.2 Metodi di rilevazione di <i>Listeria monocytogenes</i> .....	6
1.2 <i>Listeria monocytogenes</i> nei formaggi.....	7
1.3 Focolai di listeriosi da consumo di formaggi nel 2018.....	12
1.4 Criteri di sicurezza alimentare per <i>Listeria monocytogenes</i> .....	13
<b>2. OBIETTIVO.....</b>	<b>16</b>
<b>3. PRINCIPALI FATTORI DI RISCHIO RESPONSABILI DI LISTERIOSI UMANA.....</b>	<b>17</b>
3.1 Categorie di popolazione a rischio.....	17
3.1.1 Persone anziane.....	17
3.1.2 Donne in gravidanza.....	19
3.1.3 Persone immunocompromesse.....	20
3.2 Tempo e temperatura di conservazione.....	21
3.3 Abitudini alimentari e consumo .....	23
3.4 Contaminazione crociata tra alimenti e manipolazione.....	24
3.5 Trasmissione ambientale.....	25
3.6 Prevalenza e concentrazione.....	26
3.7 Virulenza del ceppo batterico.....	28
3.8 Sistemi di sorveglianza.....	29
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>31</b>
4.1 Relazione dose-risposta.....	34
4.2 Conoscenza del patogeno, della malattia e dei fattori di rischio.....	37
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>39</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>41</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* è un batterio Gram-positivo, facente parte del phylum Firmicutes, ordine Bacillales e famiglia Listeriaceae; è un microrganismo ubiquitario nell'ambiente per cui molto pericoloso e difficile da controllare.

È aerobio o anaerobio facoltativo per cui è in grado di tollerare diverse condizioni di imballaggio, è asporigeno, di piccole dimensioni, mobile tra i 20 e 30°C grazie a flagelli peritrichi, mentre a 35°C risulta immobile, è bastoncellare, catalasi positivo e ossidasi negativo. Ne esistono vari sierotipi, ma i focolai di infezione umana sono dovuti principalmente ai sierotipi 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b che sono i più virulenti (Thakur *et al.*, 2018).

È in grado di produrre listeriolisina, una proteina di invasione che lisa la membrana della cellula ospite, cosicché il batterio si possa liberare nel citoplasma e moltiplicarsi. La codifica della proteina ActA permette al batterio di accumulare actina formando una specie di coda che gli permette di muoversi ed attraversare le membrane di cellule adiacenti così da invadere lentamente tutto l'organo e causare l'infezione, senza venire mai in contatto con gli anticorpi che scorrono al di fuori delle cellule, nel sangue e nella linfa.

Oltre che negli alimenti tra cui con particolare incidenza in quelli di origine animale come prodotti a base di carne, formaggi, prodotti ittici e altri RTE dove è presente come patogeno opportunisto, si trova anche nel suolo, nelle acque e negli scarichi; coprono il ruolo di vettori di infezione anche gli animali domestici e selvatici e secondo alcuni studi è stimato che una parte di popolazione sia portatore sano di *Listeria monocytogenes*. È importante controllare la presenza del microrganismo nelle materie prime destinate alla produzione di alimenti per evitare che non vengano superati i livelli fissati come accettabili.

Tollera pH tra 4,4 e 9,6 grazie a meccanismi di adattamento basati su modificazioni degli scambi ionici della membrana cellulare o sul sistema della glutammato-decarbossilasi e secondo lo studio svolto da Kapetanakou *et al.* (2017) la sua resistenza a bassi valori di pH gli permette di sopravvivere in ambiente gastrico favorendo così la sua moltiplicazione e produzione dell'infezione. L'acido cloridrico ha un minor effetto inibitorio su *Listeria monocytogenes* rispetto agli acidi organici come acido acetico e acido lattico, ma il suo potere di sviluppare un sistema di risposta per la tolleranza agli acidi è fonte di preoccupazione per i produttori di alimenti che sfruttano gli acidi organici come conservanti alimentari e decontaminanti (Melo *et al.*, 2015).

Inoltre si moltiplica, anche se in misura ridotta, ad elevate concentrazioni di NaCl (fino al 10%) e a bassi valori di  $a_w$  grazie alla sintesi di salt shock proteins e stress acclimatation proteins e alla capacità di assimilare o sintetizzare composti osmoprotettivi molto solubili che bilanciano gli ambienti intracellulari ed extracellulari senza danneggiare la struttura e la funzione della cellula.

È un microrganismo psicrotrofo per cui si sviluppa preferibilmente a temperature tra 30 e 38°C, ma riesce a sopravvivere anche in condizioni di refrigerazione attraverso la modificazione dei lipidi di membrana per mantenerne la fluidità, la produzione di cold shock proteins ed

acclimation proteins e l'accumulo di soluti compatibili cioè molecole a basso peso molecolare che fungono da crioprotettori abbassando il punto di congelamento. La capacità di resistere fino a  $-0,1^{\circ}\text{C}$  permette a *Listeria monocytogenes* di essere un contaminante di alimenti conservati in frigo; viene disattivato invece, seppur non totalmente, dalle alte temperature, superiori a  $50^{\circ}\text{C}$ , sebbene a volte sia stata riscontrata anche dopo processi di pastorizzazione poiché può tollerare alte temperature grazie alla sintesi di chaperonine.

Presenta attività emolitica diversamente dalle altre specie di *Listeria*, fermenta glucosio, fruttosio, mannosio, galattosio, cellobiosio, trealosio e saccarosio in anaerobiosi con conseguente produzione di acidi.

Può produrre biofilm cioè aggregati multi-cellulari di batteri difficili da eliminare che possono crearsi su pavimenti, pareti, superfici porose e attrezzature, che gli permettono di sopravvivere a lungo negli stabilimenti di lavorazione e negli ambienti di nicchia sottoforma di ceppi specifici isolati che possono essere reintrodotti ripetutamente nel tempo nel prodotto che ne viene a contatto, per cui le operazioni di sanificazione diventano più impegnative ed è necessario che vengano applicate più frequentemente. In questi casi la presenza di *Listeria monocytogenes* è inevitabile, ma si può ridurre la contaminazione mantenendo l'igiene e controllando tutte le fasi di produzione: si possono limitare la colonizzazione, la trasmissione, la contaminazione crociata e la produzione di biofilm tramite procedure di pulizia e di sanitizzazione con composti dell'ammonio quaternario (Thakur *et al.*, 2018). Buchanan *et al.* (2017) hanno rilevato una possibile tolleranza di *Listeria monocytogenes* verso i disinfettanti con ammonio quaternario, acquisita dal batterio grazie a nuovi geni prodotti o mutazioni di geni esistenti.

Diversi risultati del campionamento hanno riportato una maggior probabilità della presenza di *Listeria monocytogenes* in campioni con uno o più conservanti antimicrobici rispetto a quelli con assenza o mancanza di segnalazione di conservanti o regolatori di acidità, poiché i conservanti più usati in commercio hanno un effetto antilisteriale lieve o moderato che ha effetto batteriostatico piuttosto che battericida. Inoltre gli antimicrobici possono ridurre la competitività della flora naturalmente presente, migliorando indirettamente il potenziale di crescita di *Listeria monocytogenes* (EFSA, 2018).

### 1.1.1 Sintomatologia ed incidenza della listeriosi

*Listeria monocytogenes* provoca infezioni invasive negli animali. La listeriosi umana è il risultato indesiderato dell'interazione tra l'ospite e l'agente patogeno che viene ingerito tramite il cibo: nell'uomo la malattia si può manifestare inizialmente con sintomi simil-influenzali come febbre, dolori muscolari, affaticamento e mal di testa e se non trattata con antibiotici si può evolvere come malattia grave provocando gastroenteriti, setticemia, meningite, aborto spontaneo, lesioni cutanee, altre forme cliniche atipiche e morte.

Il periodo di incubazione può essere breve cioè solo di qualche giorno nella forma non invasiva, invece in quella invasiva può essere lungo da qualche settimana a mesi e in questi casi le indagini epidemiologiche risultano essere più difficili.

La sua incidenza è bassa ma il tasso di ospedalizzazione secondo dati recenti come quelli pubblicati nell'ultimo report EFSA (EFSA, 2019), è stimato del 97% e quello di mortalità del 15,6%. La listeriosi è la causa della percentuale più elevata di casi fatali rispetto a tutte le altre infezioni zoonotiche.

Disease	Number of confirmed human cases	Hospitalisation				Deaths			
		Status available (%)	Number of reporting MS <sup>(b)</sup>	Reported hospitalised cases	Proportion hospitalised (%)	Outcome available (%)	Number of reporting MS <sup>(b)</sup>	Reported deaths	Case fatality (%)
<b>Campylobacteriosis</b>	246,571	27.7	18	20,948	30.6	72.7	16	60	0.03
<b>Salmonellosis</b>	91,857	43.2	15	16,556	41.7	67.0	17	119	0.19
<b>STEC infections</b>	8,161	37.3	18	1,151	37.8	60.4	20	11	0.22
<b>Yersiniosis</b>	6,699	26.4	14	519	29.3	56.8	15	3	0.08
<b>Listeriosis</b>	2,549	42.4	17	1,049	97.0	57.6	19	229	15.6
<b>West Nile fever<sup>(a)</sup></b>	1,548	44.7	10	634	91.6	84.6	11	137	10.5
<b>Echinococcosis</b>	793	29.6	13	109	46.4	35.1	14	3	1.10
<b>Q fever</b>	789	NA <sup>(c)</sup>	NA	NA	NA	58.7	12	8	1.70
<b>Brucellosis</b>	358	44.4	9	159	71.1	29.9	10	1	0.93
<b>Tularaemia</b>	300	32.0	11	69	71.9	47.7	11	0	0.0
<b>Trichinellosis</b>	66	21.2	6	9	64.3	27.3	6	0	0.0
<b>Rabies</b>	1	NA <sup>(c)</sup>	NA	NA	NA	100.0	1	1	100.0

MS: Member State.

(a): Instead of confirmed human cases, the total number of human cases were included.

(b): Not all countries observed cases for all diseases.

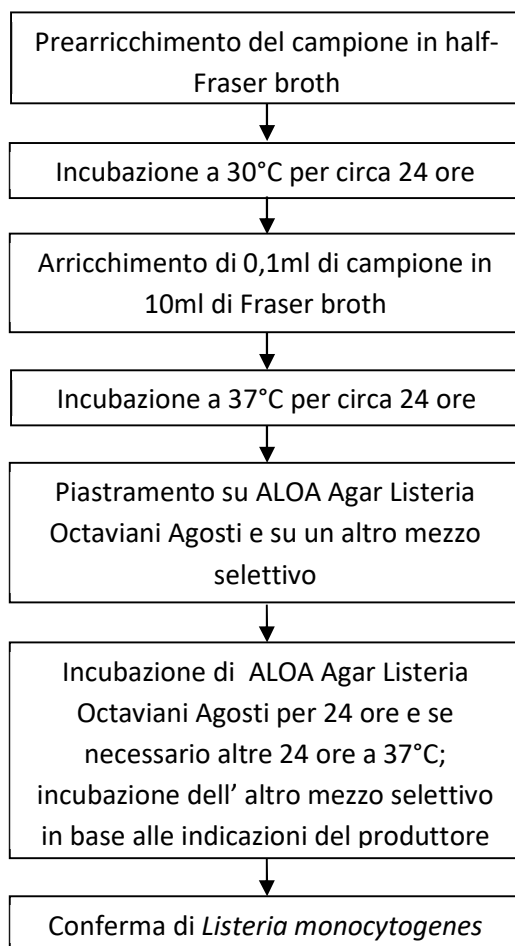
(c): NA: Not applicable as the information is not collected for this disease.

**Tabella 1:** ricoveri segnalati e decessi a causa di zoonosi in casi confermati nell'UE nel 2018

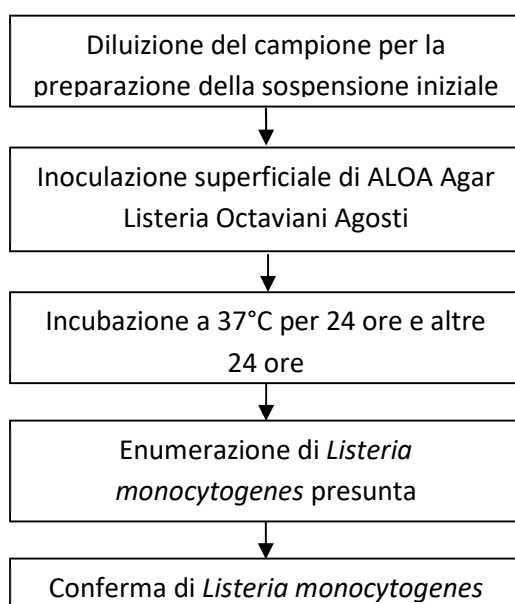
Lo sviluppo della malattia dipende dal numero di microrganismi e per *Listeria monocytogenes* è necessaria una dose infettante minima di 1000 cellule per grammo nei soggetti con basse difese immunitarie, mentre di almeno 10<sup>4</sup> UFC per grammo nei soggetti con difese immunitarie normali.

### 1.1.2 Metodi di rilevazione di *Listeria monocytogenes*

La norma ISO 11290 del 2017 riguarda il metodo di rilevazione di *Listeria monocytogenes*; la parte 1 fa riferimento alla rilevazione, la parte 2 all'enumerazione. Per la determinazione (rilevazione) si segue una procedura di questo tipo:



Mentre per la quantificazione (enumerazione/conteggio) si segue la seguente procedura:



Per lo studio di *Listeria monocytogenes* possono essere utilizzati brodi di coltura selettivi tra cui la Listeria Fraser broth o half-Fraser broth che rilevano la presenza di *Listeria monocytogenes* con alcuni agenti selettivi e l'annerimento della coltura poiché è presente cloruro ferrico di ammonio che evidenzia l'idrolisi dell'esculina (Wemmenhove, 2019). Inoltre vengono utilizzati terreni solidi agarizzati come Oxford e Palcam o ALOA ovvero Agar Listeria Ottaviani Agosti che è un terreno selettivo e differenziale contenente cloruro di litio, antimicrobici e X-glucoside che evidenzia l'attività dell'enzima  $\beta$ -glucosidasi.

La fase di conferma avviene con test biochimici o molecolari, per esempio l'analisi degli aspetti microscopici, la  $\beta$ -emolisina, L-ramnosio e D-xilosio ed eventualmente il test della catalasi, CAMP e il test della motilità a 25°C (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2017.)

Dopo una prima identificazione, per la verifica con test biochimico si può utilizzare per esempio il sistema API *Listeria* costituito da una galleria con 10 pozzetti contenenti substrati disidratati, che vengono degradati dal batterio durante l'incubazione causando un viraggio cromatico specifico in base alla sua capacità di condurre attività enzimatiche o fermentare zuccheri (Soravito, 2010).

Per identificare *Listeria monocytogenes* possono essere sfruttati anche vari metodi molecolari rapidi basati sulla PCR: real-time PCR, multiplex PCR ed altri (Thakur *et al.*, 2018).

Lo studio di Longhi *et al.* (2003) ha sviluppato un metodo rapido ed economico per la rilevazione di *Listeria monocytogenes* nei formaggi morbidi: viene amplificato un gene di virulenza caratteristico di questa specie tramite una breve fase preliminare di arricchimento seguita da una PCR in real-time con primers specifici, permettendo di rilevare anche bassi livelli del microrganismo in presenza di flora competitiva, in modo da evitare il rischio di infezione alimentare principalmente sui soggetti immunocompromessi.

Attualmente viene considerato anche il sequenziamento dell'intero genoma (WGS) per identificare il ceppo di *Listeria monocytogenes* e studiare le sue caratteristiche di virulenza, patogenicità e legame tra alimenti contaminati consumati e pazienti colpiti.

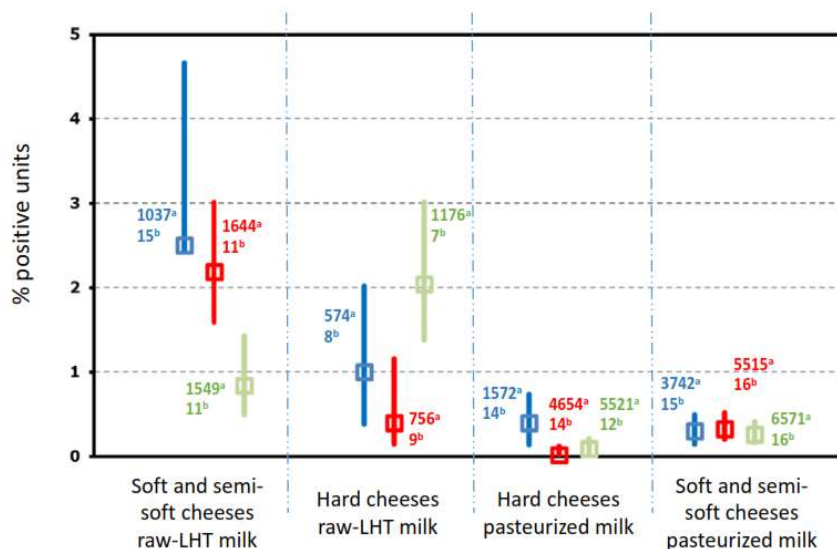
## **1.2 *Listeria monocytogenes* nei formaggi**

Generalmente i formaggi sono considerati alimenti nutrienti e sicuri per le loro proprietà fisico-chimiche e antagonistiche dei batteri lattici, ma ad oggi si sono verificate molte malattie di origine alimentare causate dal consumo di formaggi.

*Listeria monocytogenes* è stata riscontrata in tipi di formaggio prodotti tramite coagulazione acida o presamica da latte di varie specie: vaccino, di pecora, di capra e misti. Inoltre è stata rilevata sia su formaggi duri, semi-molli e molli e in particolare questi ultimi possono supportare meglio la sopravvivenza e la riproduzione del patogeno.

I risultati ottenuti da analisi su unità di campionamento indicano anche una differenza sulla base del trattamento termico che il latte subisce: *Listeria monocytogenes* è maggiormente presente in formaggi ottenuti con latte crudo o sottoposto ad un trattamento blando rispetto ai prodotti ottenuti con latte pastorizzato in cui comunque se ne può rilevare la presenza: la probabilità di contrarre un'infezione consumando formaggi prodotti con latte crudo è tra le 50 e 160 volte

superiore rispetto a quella che si ha consumando formaggi prodotti con latte pastorizzato (Choi *et al.*, 2016).



La presenza di *Listeria monocytogenes* nei formaggi può derivare dal fatto che venga utilizzato insilato contaminato e di scarsa qualità per l'alimentazione degli animali ed essi possono trasmettere l'agente patogeno sia come portatori asintomatici che versandolo nel latte. Il latte crudo può essere contaminato da animali mastitici e da apparecchiature sporche durante la mungitura, l'immagazzinamento o il trasporto e ciò può rappresentare un rischio per la salute umana se utilizzato per la produzione di formaggio senza pastorizzazione (Melo *et al.*, 2015).

Quindi la materia prima può essere fonte di contaminazione: il latte crudo può contenere un numero elevato di microrganismi, inoltre può subire un trattamento termico di pastorizzazione inadeguato e insufficiente per abbattere la carica microbica patogena e si potrebbe verificare una contaminazione post-pastorizzazione e prima della trasformazione a causa di microrganismi originari del latte crudo o derivanti dall'ambiente di produzione.

Inoltre la crescita di altri microrganismi come *Pseudomonas* può provocare l'idrolisi delle proteine del latte: la crescita di *Listeria monocytogenes* viene così stimolata grazie agli aminoacidi che si liberano. D'altra parte la crescita del patogeno è influenzata negativamente dallo sviluppo di batteri lattici naturalmente presenti nel latte o aggiunti in fasi successive della trasformazione. Quanto più è alta la concentrazione del patogeno e di altri microrganismi nella materia prima, tanto più efficace deve essere il controllo dei processi per ridurre la carica entro valori accettabili ed evitare l'incremento del potenziale di contaminazione e di persistenza nell'ambiente di lavorazione. Una pastorizzazione del latte a 82°C piuttosto che a 72°C, se non fatta nel modo ottimale, può essere associata ad un aumento del rischio di contrarre la listeriosi perché in caso di contaminazione post-processo *Listeria monocytogenes* può crescere più velocemente fino a livelli più elevati di quelli che raggiungerebbe nel caso di post-contaminazione del latte pastorizzato a basse temperature a causa dei livelli più bassi di microbiota competitivo che rimangono dopo un trattamento termico a temperature più elevate (EFSA, 2018).

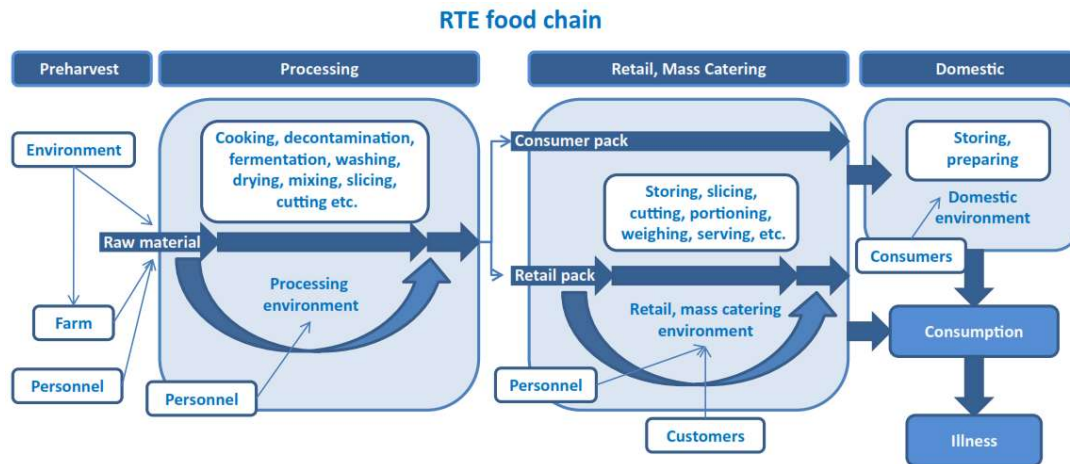


Il controllo delle temperature, così come di altri parametri come pH e tempo, è fondamentale non solo per la preparazione della materia prima, ma anche durante tutte le fasi del processo di produzione del formaggio: molte di esse (miscelazione del latte, rottura del coagulo, sosta) favoriscono la crescita del patogeno anche prima dell'ottenimento del prodotto finito, per cui se non vengono tenute sotto controllo in maniera efficace si potrebbe ottenere un prodotto con alta concentrazione microbica ancora prima della sua conservazione, distribuzione e consumo. Anche le soluzioni saline utilizzate nella fase di salatura possono essere contaminate da *Listeria monocytogenes* dove può sopravvivere da 7 a 250 giorni (Delhalle *et al.*, 2012).

Anche la composizione del latte che viene utilizzato per la produzione del formaggio non è da sottovalutare: generalmente il contenuto in lattosio e caseine non influenza la capacità di *Listeria monocytogenes* di invadere l'intestino umano e altri organi benché sia riconosciuto che alcuni ceppi non siano in grado di utilizzare il lattosio come unica fonte di carbonio, mentre il contenuto in lipidi condiziona le caratteristiche del patogeno, infatti è stato dimostrato che quantità consistenti di acidi grassi inibiscono la crescita e riducono la capacità di invasione del microrganismo (Melo *et al.*, 2015).

La contaminazione da *Listeria monocytogenes* avviene soprattutto in fase di elaborazione: si può avere contaminazione delle attrezzature, dell'ambiente e del personale (World Health Organization, 2004). Lo studio di Kahraman *et al.* (2010) ha rilevato che i produttori di alimenti possono essere serbatoi e vettori di *Listeria monocytogenes*: gli indumenti, le scarpe ma principalmente le mani possono essere fonte di contaminazione microbica; per abbassare il rischio è necessario che gli operatori indossino i guanti quando entrano in contatto con gli alimenti.

La capacità del microrganismo di produrre biofilm gli permette di persistere sulle superfici biotiche e abiotiche e, diffondendosi nel prodotto, rimanere vitale e moltiplicarsi durante il periodo di conservazione e la capacità del patogeno di resistere ad alte concentrazioni di sale gli dà la possibilità di contaminare le soluzioni saline che si utilizzano per la fase di salatura e svilupparsi durante la maturazione del formaggio (Melo *et al.*, 2015). La contaminazione avviene anche prima dell'imballaggio finale, sul punto vendita (principalmente al banco quando le confezioni vengono aperte) e a livello del consumatore finale a causa della cattiva conservazione. Lo schema sottostante riporta le principali fasi della filiera in cui un prodotto RTE come un formaggio può essere contaminato da *Listeria monocytogenes*: tutte le fasi della catena alimentare sono una possibile fonte del microrganismo patogeno. Oltre alle fasi, ci sono vari attori della filiera che devono avere una gestione curata degli alimenti per garantire la sicurezza: agricoltori, trasportatori, trasformatori, ristoratori, rivenditori, istituzioni che agiscono tramite monitoraggio, ispezioni ed emanando regolamenti ed infine il consumatore finale.



**Figura 1:** panoramica schematica delle vie di trasmissione di *Listeria monocytogenes* negli alimenti RTE

I formaggi sono considerati alimenti RTE ovvero prodotti destinati al consumo diretto da parte del consumatore senza subire alcun trattamento risanante, ad esempio la cottura, atto ad eliminare o ridurre a livello accettabile i microrganismi che destano preoccupazione.

La composizione ricca di nutrienti del formaggio, il contenuto di umidità e di sale che possono essere molto variabili, il pH e le condizioni di maturazione influenzano, generalmente favorendo, la presenza e la crescita di *Listeria monocytogenes* come riscontrato anche dallo studio di Melo et al. (2015). Per esempio i formaggi morbidi permettono la crescita di *Listeria monocytogenes* grazie alle loro caratteristiche intrinseche come pH sufficientemente alto (5,0-6,3), alta  $a_w$  (>0,97), alta umidità (55-58% e più) e bassa quantità di sale (1,4-1,6%) (Campagnollo et al., 2018). In un formaggio morbido, contenente più fase liquida, il tasso di diffusione delle molecole è più alto, i nutrienti consumati vengono rapidamente sostituiti e il batterio può muoversi verso zone più ricche di nutrienti come fonti di carbonio e crescere in forma planctonica. Tanto più, se viene utilizzato latte crudo e condizioni igieniche non idonee, la via di contaminazione da *Listeria monocytogenes* è favorita (EFSA, 2018).

In alcuni formaggi con la crosta come Brie e Camembert, la contaminazione è stata rilevata solo sulla parte più esterna poiché generalmente è caratterizzata da un pH più elevato, che favorisce lo sviluppo di *Listeria monocytogenes*, mentre la pasta è risultata esente dall'agente patogeno.

I formaggi a lunga stagionatura risultano essere più sicuri contro lo sviluppo del microrganismo d'interesse, anche se talvolta ne è stata registrata la presenza poiché l'aumento del pH durante la maturazione ne ha favorito lo sviluppo (Gérard et al., 2018).

Martinez-Rios et al. (2019) hanno dimostrato che i sali di fusione come citrati e fosfati che vengono utilizzati per ottenere le proprietà caratteristiche dei formaggi fusi spalmabili o non, hanno effetti inibitori sulla crescita di *Listeria monocytogenes* permettendo una conservazione più lunga del prodotto; ultimamente però sono stati fatti dei richiami alimentari per rischio listeriosi anche in questi tipi di alimento.

Queste caratteristiche del prodotto insieme al metodo di conservazione, non solo possono favorire lo sviluppo di *Listeria monocytogenes* ma possono migliorare la sua sopravvivenza e

virulenza, infatti se il microrganismo è esposto a condizioni subletali di stress può indurre lo sviluppo della tolleranza a livelli più alti dello stesso stress o di altri stress. Tale meccanismo di protezione incrociata è importante negli alimenti RTE come i formaggi che spesso vengono conservati a temperature di refrigerazione in cui il microrganismo trova condizioni idonee per lo sviluppo, per cui sono considerati come uno dei principali veicoli alimentari che causano focolai di listeriosi.

Anche se il formaggio viene confezionato sotto vuoto o in atmosfera modificata con un basso contenuto di ossigeno, *Listeria monocytogenes* può svilupparsi poiché essendo un batterio anaerobio facoltativo è in grado di regolare il suo metabolismo in funzione delle caratteristiche dell'ecosistema in cui si trova. In condizioni di refrigerazione il confezionamento in atmosfera modificata con una concentrazione più elevata di CO<sub>2</sub> eventualmente associata ad alta pressione, provoca un ritardo della crescita di *Listeria monocytogenes* nei formaggi grazie all'effetto batteriostatico, ma successivamente all'apertura della confezione il microrganismo si sviluppa più rapidamente con un incremento notevole del numero di cellule, per cui il confezionamento MAP può prolungare la shelf-life del prodotto ma non è la soluzione adatta per prevenire la crescita del patogeno (Whitley *et al.*, 2000).

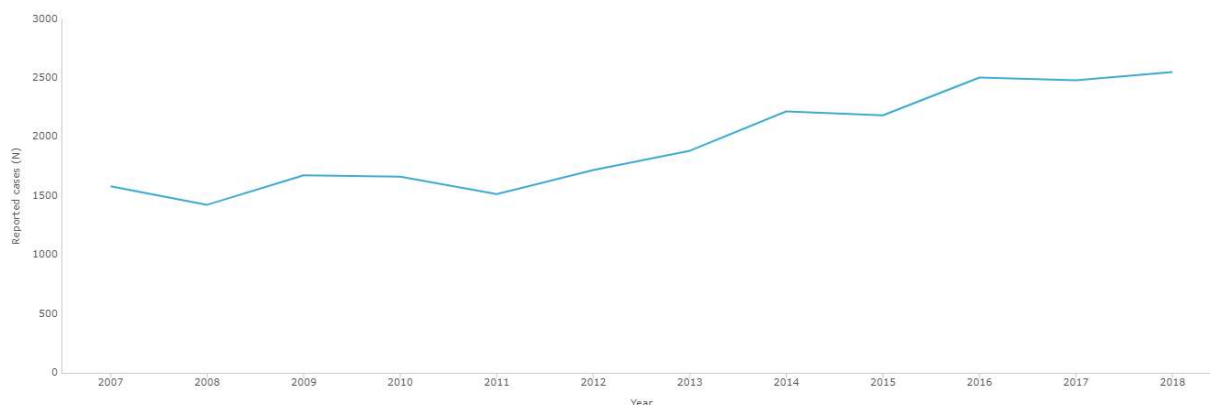
Inoltre il microrganismo si può ritrovare sia in formaggi confezionati interi che pre-affettati e quanto più il periodo di conservazione è lungo, tanto più il patogeno ha tempo per svilupparsi.



**Figura 2:** alcuni tipi di formaggio in cui si può verificare la contaminazione da *Listeria monocytogenes*

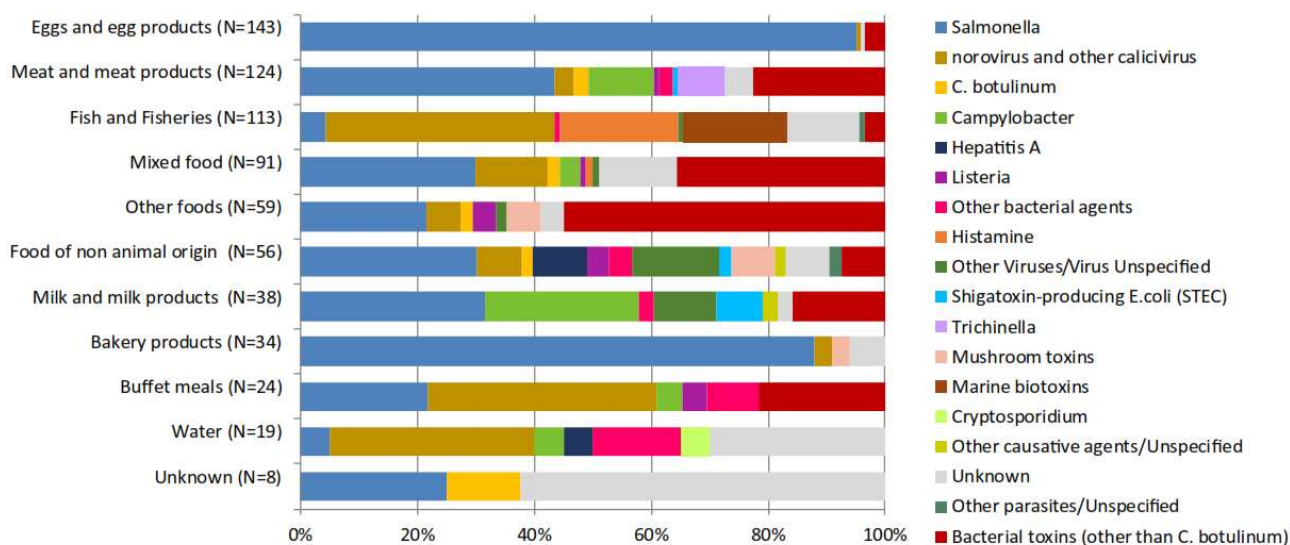
### 1.3 Focolai di listeriosi da consumo di formaggi nel 2018

Secondo quanto riportato dal report EFSA 2019, negli ultimi anni c'è stato un aumento dei casi di listeriosi e il tasso di mortalità è pari a 15,6%, per cui la listeriosi è considerata una delle malattie più gravi di origine alimentare sotto sorveglianza dell'UE (EFSA, 2019).



**Figura 3:** andamento del numero di casi di listeriosi in UE negli ultimi anni

Il report EFSA (EFSA, 2019) riporta che gli agenti causali più importanti di tossinfezioni alimentari legati a latte e derivati sono *Salmonella*, *Campylobacter* ed *E.coli* STEC; nel 2018 non ci sono stati focolai tossinfettivi da *Listeria monocytogenes* introdotto direttamente da derivati del latte ma è necessario tenerlo in considerazione perché, benché abbia una bassa incidenza, ha un tasso di ospedalizzazione e una percentuale di mortalità più alti rispetto agli altri microrganismi, per questo lo studio che segue si focalizza principalmente su questo batterio.



**Figura 4:** distribuzione di frequenza di agenti causali associati a focolai di origine alimentare e idrica, da parte di veicoli alimentari negli stati membri dell'UE

Il report EFSA (EFSA, 2019) evidenzia un aumento della presenza di *Listeria monocytogenes* nei prodotti RTE negli ultimi anni, con una maggior incidenza nei prodotti lattiero-caseari.

	2018	2017	2016	2015	2014
<b>Categorie di cibo RTE</b>					
Latte e derivati	59,313	56,428	34,85	45,996	68,497
Carne e derivati	57,861	45,219	25,195	25,396	18,72
Pesce e derivati	14,081	12,604	6,601	7,986	29,341
Altri prodotti	25,179	23,915	21,085	25,544	32,126
Cibi RTE per neonati e per fini medici speciali	1,663	1,462	1,274	1,754	1,233

**Tabella 2:** unità di campionamento per ogni categoria alimentare esposta a contaminazione da *Listeria monocytogenes*: maggiore incidenza in prodotti lattiero-caseari

Inoltre sono stati registrati dei casi di non accettabilità secondo i criteri del regolamento 2073/2005 per alcuni prodotti della categoria RTE di cui fa parte la maggior parte dei formaggi: al dettaglio lo 0,13% dei campioni di formaggi a pasta molle e semi-molle è stato segnalato come positivo per *Listeria monocytogenes*, mentre durante le fasi di elaborazione sono stati registrati valori pari a 0,37% di positività al patogeno.

In formaggi fatti da latte di diverse specie, lo 0,44% dei campioni era positivo e durante le fasi di elaborazione lo era l'1,02% dei campioni. Non sono stati riscontrati casi di positività al dettaglio e durante le fasi di elaborazione per formaggi a pasta dura.

La maggior parte dei casi di listeriosi causati dal consumo di formaggi appare sporadica e con andamento stagionale con picchi estivi tra giugno ed ottobre e a gennaio e fortunatamente la frequenza con la quale le persone sono esposte a *Listeria monocytogenes* appare molto più alta rispetto all'incidenza reale della malattia.

I dati EFSA riportano che la maggior parte dei casi di listeriosi invasiva è causata all'ingestione di alimenti RTE con più di 2000 UFC/g e un terzo dei casi è dovuto alla crescita del microrganismo durante la fase di conservazione a livello del consumatore (EFSA, 2019).

## 1.4 Criteri di sicurezza alimentare per *Listeria monocytogenes*

Il pericolo rappresentato da *Listeria monocytogenes* come contaminante di diversi ecosistemi tra cui gli alimenti è sentito a livello mondiale ed oggi è affrontato dalle varie istituzioni tramite l'emanazione di leggi o altre strategie. Gli enti comunitari europei hanno emanato un regolamento specifico per garantire un elevato livello di protezione della salute pubblica.

Il regolamento 2073 del 2005 è relativo ai 'Criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari': afferma che "i prodotti alimentari non devono contenere microrganismi, né loro tossine o metaboliti, in quantità tali da rappresentare un rischio inaccettabile per la salute umana". Sono stati fissati per le varie categorie alimentari criteri microbiologici di sicurezza e di igiene per i quali il rispetto deve essere garantito e controllato dagli OSA (operatori del settore

alimentare) attraverso il prelievo di campioni e analisi. Un criterio microbiologico definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all'assenza, alla presenza o al numero di microrganismi e/o in base alla quantità delle relative tossine/metaboliti, per unità di massa, volume, area o partita. Attraverso i criteri microbiologici è possibile definire l'accettabilità del processo di produzione e del prodotto in sé durante la sua formazione e durante il periodo di conservabilità quando è già immesso sul mercato.

Il regolamento, nella sezione contenente i criteri di sicurezza, fissa dei limiti di accettabilità relativamente ad alcuni microrganismi tra cui *Listeria monocytogenes* per i prodotti pronti immessi sul mercato o prima che non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare.

Categoria alimentare	Microrganismi/loro tossine, metaboliti	Piano di campionamento (1)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio
		n	c	m	M		
1.1. Alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali (4)	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Assente in 25 g		EN/ISO 11290-1	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.2. Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g (5)		EN/ISO 11290-2 (6)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
		5	0	Assente in 25 g (7)		EN/ISO 11290-1	Prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce
1.3. Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali (4) (8)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2 (6)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

**Tabella 3:** criteri di sicurezza da applicare ad alimenti pronti al consumo

- Il punto 1.1. specifica che negli alimenti RTE destinati ai neonati e per scopi medici speciali *Listeria monocytogenes* deve essere assente in 25 g di campione in ognuna delle 10 unità campionarie durante il periodo di conservabilità del prodotto immesso sul mercato
- Il punto 1.2. specifica che negli alimenti RTE capaci di rappresentare un terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*, in 5 unità che costituiscono il campione, non si devono superare le 100 UFC/g durante il periodo di conservabilità del prodotto immesso sul mercato o il microrganismo deve risultare assente in 25 g di campione prima che il prodotto non sia più sotto il controllo diretto dell'OSA che l'ha prodotto
- Il punto 1.3. specifica che negli alimenti incapaci di rappresentare un terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes* non si devono superare le 100 UFC/g in 5 unità campionarie durante il periodo di conservabilità del prodotto alimentare immesso sul mercato

Questo criterio di sicurezza include anche i formaggi poiché sono prodotti pronti al consumo e possono costituire terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*: in 5 unità costituenti il campione di formaggio, il batterio deve essere assente in 25 g prima che l'alimento non sia più sotto il controllo dell'OSA o deve essere al di sotto di 100 UFC/g durante il periodo di conservabilità in prodotti immessi sul mercato a patto che il produttore sia in grado di dimostrare che il livello non verrà superato durante tutta la shelf-life del prodotto. Se necessario gli OSA possono condurre studi per verificare il rispetto dei criteri per tutta la durata della conservazione del prodotto, principalmente per i RTE che possono rappresentare un rischio per la salute del consumatore essendo in grado di sostenere la crescita di *Listeria monocytogenes*. Alcune categorie di formaggio come quelli a pasta dura vengono considerati come substrati non in grado di sostenere la crescita di *Listeria monocytogenes* poiché subiscono una fase di maturazione in cui il pH si abbassa e si raggiungono valori moderati di  $a_w$ , perciò ad essi si applica solo il criterio di massima concentrazione di 100 UFC/g.

## 2. OBIETTIVO

Dopo un calo dei consumi di formaggi e latticini verificatosi dal 2012 al 2016, oggi il trend è nuovamente in leggero aumento: il settore lattiero-caseario riveste particolare importanza siccome copre un'ampia fetta delle spese per acquisti di prodotti agroalimentari (13,8% sul totale) (ISMEA, 2019). L'incremento dei consumi è favorito dalla maggiore informazione relativa alla provenienza degli alimenti e delle materie prime utilizzate, dalle loro caratteristiche organolettiche-nutrizionali e quelle dei processi produttivi, dalla possibilità di diversificazione e innovazione dei prodotti quindi all'ampia gamma che il mercato europeo offre.

I benefici per la salute derivanti dai formaggi includono proprietà probiotiche naturali e antitumorali; inoltre i formaggi sono ricchi di calcio, fosforo e proteine e diminuiscono la possibilità di insorgenza del diabete di tipo II (Choi *et al.*, 2016).

I formaggi sono ampiamente consumati da popolazioni di tutte le fasce d'età; sono in grado di soddisfare il fabbisogno dei consumatori non solo per le caratteristiche nutrizionali e organolettiche, ma anche per la facilità e comodità d'uso.

Negli ultimi anni l'industria lattiero-casearia e le autorità sanitarie pubbliche hanno focalizzato maggiormente le loro attenzioni sul monitoraggio dei prodotti e dei processi per garantire sicurezza, igiene e qualità e ridurre il rischio di focolai tossinfettivi causati da *Listeria monocytogenes*. I formaggi, infatti, costituiscono un substrato favorevole per lo sviluppo microbico e in particolare anche di *Listeria monocytogenes* che è un batterio pericoloso per la sua letalità; generalmente hanno un pH superiore a 5 e valori di  $a_w$  maggiori a 0,94. Il patogeno è in grado di resistere ai fattori intrinseci che caratterizzano l'ecosistema formaggio e tollera condizioni estreme per cui può persistere in ambienti di lavorazione del latte.

Nonostante la legislazione europea sia intervenuta con regolamenti per controllare e prevenire la contaminazione dei prodotti, *Listeria monocytogenes* è un agente patogeno molto resistente e la sua ubiquitarietà rende più difficili i metodi di controllo. Spesso vengono ritirati dal mercato formaggi di vario tipo e origine per rischio listeriosi e il Sistema di Allarme Rapido a livello europeo notifica numerosi casi di allerta per presenza di *Listeria monocytogenes* nei formaggi, che potrebbero portare un rischio per la salute dei consumatori.

La listeriosi si può manifestare su individui di ogni età, genere e stato di salute ma secondo quanto riportato dai dati EFSA (EFSA, 2019) e negli studi riportati in questo elaborato ci sono categorie di popolazione particolarmente a rischio. Oltre alle proprietà intrinseche dei formaggi e le caratteristiche del batterio patogeno, ci sono alcuni elementi che accrescono la probabilità di comparsa della listeriosi nelle categorie di popolazione vulnerabili. Spesso gli studi, le valutazioni del rischio e gli interventi mirati fanno riferimento principalmente alle categorie di consumatori più fragili ed esposte poiché sono quelle in cui più probabilmente *Listeria monocytogenes* causa infezione e i focolai originati da questo batterio comprendono in primo luogo individui appartenenti a tali categorie. Il report EFSA 2019 (EFSA, 2019) infatti riporta per i gruppi di popolazione ad alto rischio, che il 48% dei casi di listeriosi è attribuito alle persone di età avanzata, il 41% alle donne in gravidanza e il restante 11% ad altre categorie.

Questo elaborato ha lo scopo di identificare e valutare quali siano i maggiori fattori di rischio relativi alla possibilità di contrarre listeriosi nelle categorie dei consumatori che risultano più esposte e sensibili all'insorgenza della malattia.



### 3. PRINCIPALI FATTORI DI RISCHIO RESPONSABILI DI LISTERIOSI UMANA

#### 3.1 Categorie di popolazione a rischio

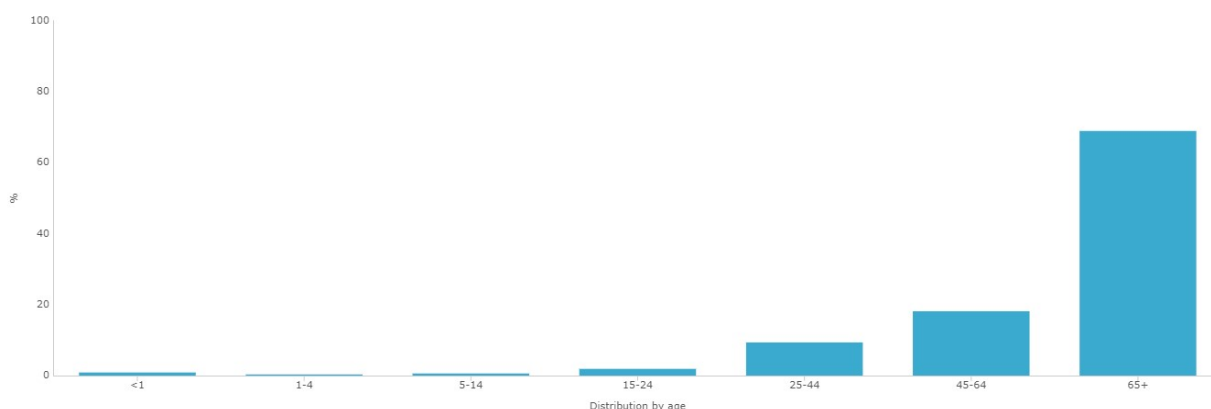
Appartenere ad una categoria di popolazione vulnerabile è associato che sia il maggior fattore di rischio che possa aumentare la possibilità di insorgenza di listeriosi. È un fattore di rischio associato all'ospite.

*Listeria monocytogenes* resiste alle condizioni dello stomaco e attraversa la barriera intestinale entrando così nel flusso sanguigno e raggiungendo gli organi in cui causa l'infezione: a contatto con i tessuti bersaglio dell'ospite, l'invasione si innesca grazie ad un'estensione localizzata della membrana plasmatica attorno al batterio affinché venga interiorizzato all'interno del compartimento cellulare. Contribuiscono all'interazione anche alcuni fattori di invasione tra cui le internaline come la listeriolisina, le fosfolipasi e la proteina ActA. In alcune categorie di popolazione *Listeria monocytogenes* più facilmente mostra la sua virulenza e pericolosità per cui tali categorie sono considerate più esposte al rischio (Pizarro-Cerda *et al.*, 2019).

L'aumento del numero di persone sensibili a causa dell'aumento dell'età o di una suscettibilità maggiore aumenterà in futuro il numero di casi di listeriosi invasiva nell'uomo (EFSA, 2018).

##### 3.1.1 Persone anziane

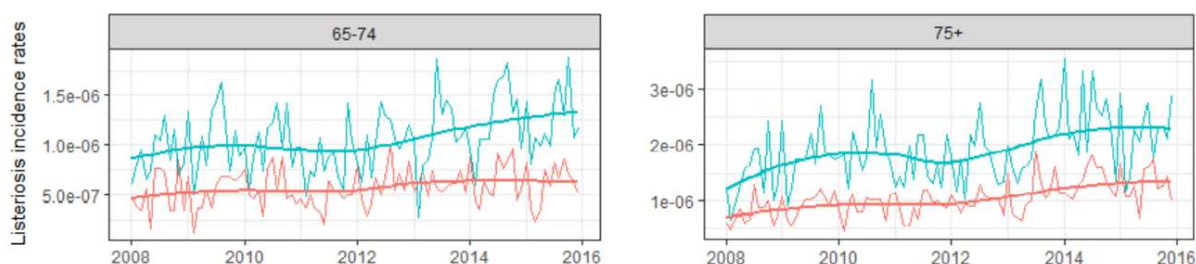
Gli ultimi dati EFSA (EFSA, 2019) riportano che le infezioni da *Listeria monocytogenes* si riscontrano più comunemente nella fascia d'età superiore a 64 anni e in particolare negli individui con più di 84 anni. La listeriosi in queste fasce d'età si manifesta principalmente come infezione nel flusso sanguigno.



**Figura 5:** distribuzione dei casi di listeriosi in base all'età in UE registrati nell'anno 2018

La percentuale di casi di listeriosi nella fascia d'età superiore a 64 anni è aumentata dal 56,0% nel 2008 al 69,1% nel 2018 e per quanto riguarda gli individui con età superiore a 84 anni l'incremento è andato da 7,3% a 14,5%, quindi i casi umani in questa fascia d'età sono quasi raddoppiati.

Anche i casi fatali sono aumentati dal 64,9% nel 2008 al 74,2% nel 2018; la mortalità per caso è stata del 16,2% e del 17,9% rispettivamente per gli individui con età superiore a 64 anni e superiore a 84 anni. La media dei casi di listeriosi umana in questa categoria di popolazione per milione di porzioni servite è di  $1,15 \cdot 10^{-4}$  a proposito dei formaggi molli e semi-molli affettati e di  $6,27 \cdot 10^{-5}$  a causa di formaggi non affettati, quindi il rischio raddoppia con manipolazioni come il taglio. Oltre a ciò vengono stimati 11 casi di listeriosi all'anno sulla popolazione anziana causati dal consumo di formaggi a pasta molle o semi-molle.



**Figura 6:** incremento del tasso di incidenza della listeriosi nelle donne (linea rossa) e negli uomini (linea blu) nelle fasce d'età avanzata (EFSA, 2018)

L'invecchiamento della popolazione, oltre ad essere un fattore di rischio, è una delle cause dell'aumento delle infezioni da *Listeria monocytogenes* in Europa.

L'età avanzata impatta negativamente sulla capacità dell'individuo di combattere la malattia causata da *Listeria monocytogenes*; il sistema immunitario delle persone in età avanzata è più debole nel difendere l'organismo dalle patologie per cui risultano essere più esposte anche alle malattie di origine alimentare; inoltre una maggiore suscettibilità può essere dovuta ai cambiamenti del tratto gastrointestinale, all'uso di farmaci e alla sedentarietà. Tutti questi fattori predispongono le persone anziane ad una maggiore vulnerabilità ad un'ampia serie di malattie per cui le categorie di popolazione "anziani" e "immunocompromessi" non sono totalmente indipendenti. L'Organizzazione mondiale della sanità ha riportato una suscettibilità alle malattie gravi 2,6 volte superiore negli anziani rispetto alla popolazione sana.

Sono state registrate infezioni dovute al consumo da parte di persone anziane di formaggi contaminati sia a livello domestico probabilmente dopo una manipolazione scorretta ma anche in strutture di assistenza a lungo termine dove venivano normalmente serviti alimenti ad alto rischio ai residenti con età superiore a 65 anni (Dalton *et al.*, 2011).

È un importante fattore di rischio da tenere in considerazione poiché si presume che nei prossimi anni la popolazione appartenente alle fasce avanzate di età aumenterà in Europa.

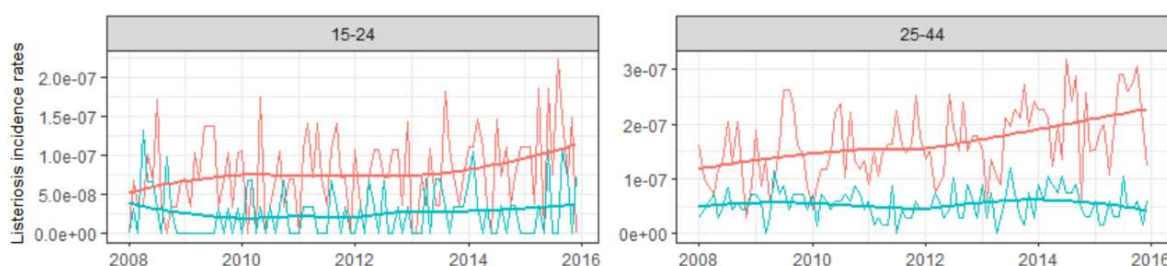
### 3.1.2 Donne in gravidanza

Un'altra categoria di consumatori a rischio è rappresentata dalle donne in gravidanza: la maggior parte di questi casi di listeriosi si verifica in donne sane (generalmente nella fascia d'età tra 25 e 44 anni) senza altri fattori predisponenti ma che entrano a far parte della categoria di popolazione più vulnerabile poiché durante la gravidanza le difese immunitarie dell'organismo si indeboliscono. Esse hanno una probabilità 17 volte superiore di contrarre la listeriosi rispetto alle altre donne in età riproduttiva e alla popolazione generale sana (Dumitrascu *et al.*, 2020).

Nella donna la listeriosi si può manifestare prevalentemente durante il terzo trimestre di gravidanza con nessun sintomo o con sintomi simil-influenzali come brividi, febbre e mal di testa, però l'infezione può passare al feto attraverso la placenta e si può manifestare come listeriosi congenita, parto prematuro o aborto. Se la malattia si manifesta all'inizio della gestazione c'è maggior probabilità di aborto spontaneo, mentre se avviene verso la fine del periodo di gestazione c'è maggior probabilità che il bambino nasca malato di listeriosi o si ammali durante o dopo il parto per contaminazione dalla madre o meno frequentemente da un altro bambino sintomatico. Le madri che hanno riferito di avere sintomi durante la gravidanza avevano maggior probabilità di partorire un feto morto o avere un aborto spontaneo e ciò era legato principalmente all'ingestione di una dose elevata di *Listeria monocytogenes* con il cibo. Il periodo di incubazione medio stimato è di 27,5 giorni, molto superiore ad altre forme cliniche e rispetto a quello medio di altre categorie di popolazione, presumibilmente poiché c'è un ritardo tra batteriemia ed infezione del feto a causa del tempo necessario per la colonizzazione della placenta da parte di *Listeria monocytogenes* e la manifestazione dell'infezione fetale (Awofisayo *et al.*, 2015).

I dati riportano che negli ultimi anni circa il 64% dei casi di listeriosi nelle donne di età tra 15 e 24 anni e tra 25 e 44 anni era associato allo stato di gravidanza. È possibile che i dati non siano completi poiché non sempre a donne che hanno abortito a causa della listeriosi viene diagnosticata la malattia. Alcuni studi hanno comunque evidenziato il legame tra l'alta incidenza di aborti in determinate popolazioni e il consumo di alimenti ad alto rischio di contaminazione da *Listeria monocytogenes* tra cui i formaggi (EFSA, 2018).

Diversi focolai di listeriosi registrati in America erano correlati a formaggi a pasta molle prodotti con latte crudo e consumati da donne in gravidanza: in uno di questi sono stati registrati 38 casi di infezione che comprendevano 13 donne in gravidanza, di cui 5 hanno avuto parto prematuro e 3 hanno perso il neonato alla nascita o poco dopo (Jackson *et al.*, 2010).



**Figura 7:** incremento del tasso di incidenza della listeriosi nelle donne (linea rossa) nelle fasce d'età 15-24 e 25-44 anni presumibilmente legato alla gravidanza (EFSA, 2018)

La media dei casi di listeriosi umana in questa categoria di popolazione per milione di porzioni servite è di  $1,98 \cdot 10^{-3}$  dovuta al consumo di formaggi molli e semi-molli affettati e di  $1,07 \cdot 10^{-3}$  a causa di formaggi non affettati, quindi il rischio è circa il doppio nel caso in cui il formaggio venga tagliato ed è superiore al rischio espresso come casi di listeriosi umana per milioni di porzioni per la popolazione anziana; inoltre il numero stimato di casi di listeriosi per anno dovuto al consumo di formaggi molli e semi-molli da parte delle donne in gravidanza è pari a tre (EFSA, 2018).

Spesso nelle donne in gravidanza infette la *Listeria monocytogenes* viene isolata dal sangue, placenta o liquido cerebrospinale che normalmente sono siti sterili; una volta che subiscono l'infezione solitamente vengono ricoverate in ospedale e se si agisce tempestivamente con un trattamento antibiotico si può curare la malattia nella madre ed evitare l'infezione nel nascituro. In un caso clinico registrato una donna in gravidanza sintomatica ha partorito un bambino sano dopo essere stata sottoposta ad un trattamento antibiotico mirato per cui viene sottolineata l'importanza della diagnosi precoce sulla madre per evitare il rischio sul nascituro (Awofisayo *et al.*, 2015).

### **3.1.3 Persone immunocompromesse**

Le persone che hanno un sistema immunitario indebolito a causa di malattie come cancro, diabete e problemi al fegato o ai reni o a causa di trattamenti medici sono maggiormente a rischio per la contrazione di listeriosi. Tale categoria di popolazione è in aumento poiché i tassi di mortalità dovuti a queste malattie sono diminuiti per cui in relazione si ha un numero maggiore di individui che possono far parte della categoria di popolazione sensibile a malattie di altro genere, tra cui quelle di origine alimentare come la listeriosi. Anche chi soffre di problemi gastrici e prende farmaci come i soppressori dell'acido gastrico è maggiormente suscettibile a infezioni enteriche poiché nel loro stomaco è meno marcata la barriera contro le infezioni batteriche.

Secondo Preubel *et al.* (2015) la probabilità di contrarre la listeriosi in persone che hanno ricevuto terapie immunosoppressive è nove volte maggiore rispetto a quella delle persone con condizioni di salute non compromesse e quasi tre volte superiore rispetto a quella di persone immunocompromesse che non subiscono terapie.

Per gli individui immunocompromessi la dose infettiva di *Listeria monocytogenes* in grado di causare la malattia è più bassa rispetto a quella che può provocare l'infezione in persone sane, ma comunque i criteri di sicurezza definiti dalla legislazione europea (100 UFC per grammo in alcuni tipi di prodotto) sono dei limiti precauzionali poiché è necessaria una quantità più elevata di batterio affinché si manifesti l'infezione in primis nelle persone con sistema immunitario più debole.

D'altro canto in molti Paesi mancano raccomandazioni dietetiche per la prevenzione delle malattie di origine alimentare negli individui immunodepressi per cui spesso sono esposti al rischio di ammalarsi a causa del consumo di alimenti considerati come probabili fonti di microrganismi patogeni.

Benché il luogo di esposizione, cioè dove il cibo è stato consumato sia principalmente l'ambiente domestico, sono stati registrati dei casi di listeriosi anche in ospedale o in strutture di assistenza

medica dove la proporzione di individui sensibili all'infezione da *Listeria monocytogenes* è più elevata rispetto alle altre categorie di popolazione e ad altri luoghi.

### 3.2 Tempo e temperatura di conservazione

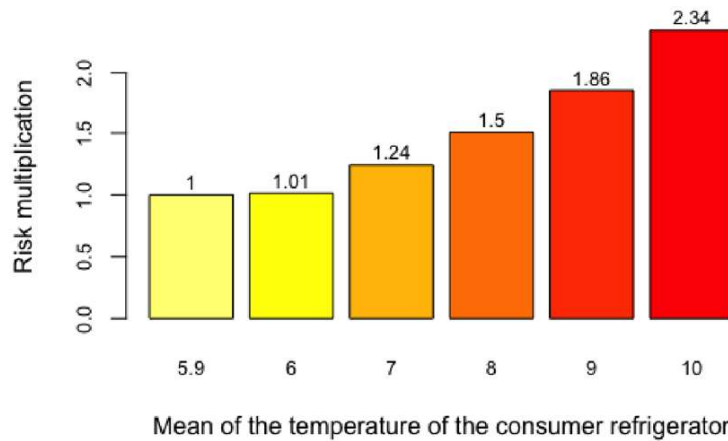
Tra i parametri più difficili da controllare per evitare di contrarre la listeriosi c'è il mantenimento della giusta temperatura di conservazione e il rispetto dei tempi per il consumo di alimenti a rischio come i formaggi. Le pratiche non sicure di conservazione non sono rare nella popolazione e in particolare nella categoria di popolazione di età più avanzata.

È stato riscontrato infatti che le persone anziane gestiscono il cibo in maniera diversa rispetto ai giovani: applicano più frequentemente pratiche di refrigerazione errate e spesso non fanno attenzione alla data di scadenza dell'alimento o non ne conoscono il significato (EFSA, 2018).

Mentre nelle prime fasi della catena generalmente le temperature vengono mantenute a valori controllati e adeguati, quelle dei frigoriferi dei punti vendita e di quelli domestici sono molto variabili ed è difficile che rimangano sempre nell'intervallo ottimale per la conservazione di ogni specifico prodotto. A livello di vendita al dettaglio sono state registrate temperature inferiori rispetto a quelle registrate durante la conservazione domestica, anche se i valori possono variare molto in funzione del tipo di frigorifero, da quanto è pieno e della posizione del prodotto all'interno di esso ed è possibile che avvengano sbalzi di temperatura che influenzano la crescita microbica. Non è raro che le temperature di refrigerazione definite dalla legge vengano violate anche per un periodo di tempo considerevole e la combinazione di questi fattori può favorire lo sviluppo di *Listeria monocytogenes* (Lundén *et al.*, 2014).

La temperatura media dei frigoriferi domestici registrata da vari studi è tra 5 e 8,1°C, ma anche in questo caso dipende dal tipo di frigorifero e da quanto tempo è in funzione. Normalmente una temperatura considerata sicura per la conservazione dei prodotti è di massimo 5°C.

Negli ultimi anni il controllo inadeguato delle temperature è stato riconosciuto come una delle cause dell'aumento del numero di focolai di tossinfezione alimentare, così come per la listeriosi poiché il tempo di generazione del patogeno diminuisce notevolmente quando le temperature di conservazione aumentano (Evans *et al.*, 2015). Più la temperatura del frigorifero domestico è elevata, più aumenta il rischio di listeriosi invasiva nell'uomo (EFSA, 2018).



**Figura 8:** incremento del rischio di listeriosi invasiva nell'uomo in funzione della temperatura media del frigorifero del consumatore

I consumatori non sono sempre attenti al tempo di conservazione del prodotto: nell'etichetta della maggior parte dei formaggi vi è scritto "da consumare entro" per cui viene definita una data di scadenza entro cui deve tassativamente essere consumato per evitare rischi per la salute, mentre in altri vi è scritto "da consumare preferibilmente entro" ovvero è indicato un termine minimo di conservazione entro cui il prodotto alimentare conserva le sue proprietà in adeguate condizioni di conservazione e oltre il quale non diventa dannoso per la salute per cui può essere ancora consumato. Spesso i consumatori non conoscono la differenza tra questi termini per cui non è raro che i tempi di conservazione non vengano rispettati e il rischio di sviluppo dei microrganismi patogeni tra cui *Listeria monocytogenes* aumenti. Oltre alla cattiva interpretazione delle indicazioni, alcuni studi riportano la difficoltà di leggere ciò che è scritto in etichetta, principalmente per la categoria di popolazione di età avanzata: essi più spesso consumano prodotti RTE associati a *Listeria monocytogenes* conservati per lungo tempo per cui il rischio di listeriosi si accresce (Evans *et al.*, 2016).

Generalmente per i formaggi non ci sono indicazioni relative alla shelf-life secondaria e le raccomandazioni per il consumo dei prodotti aperti entro due giorni dall'apertura non vengono sempre rispettate.

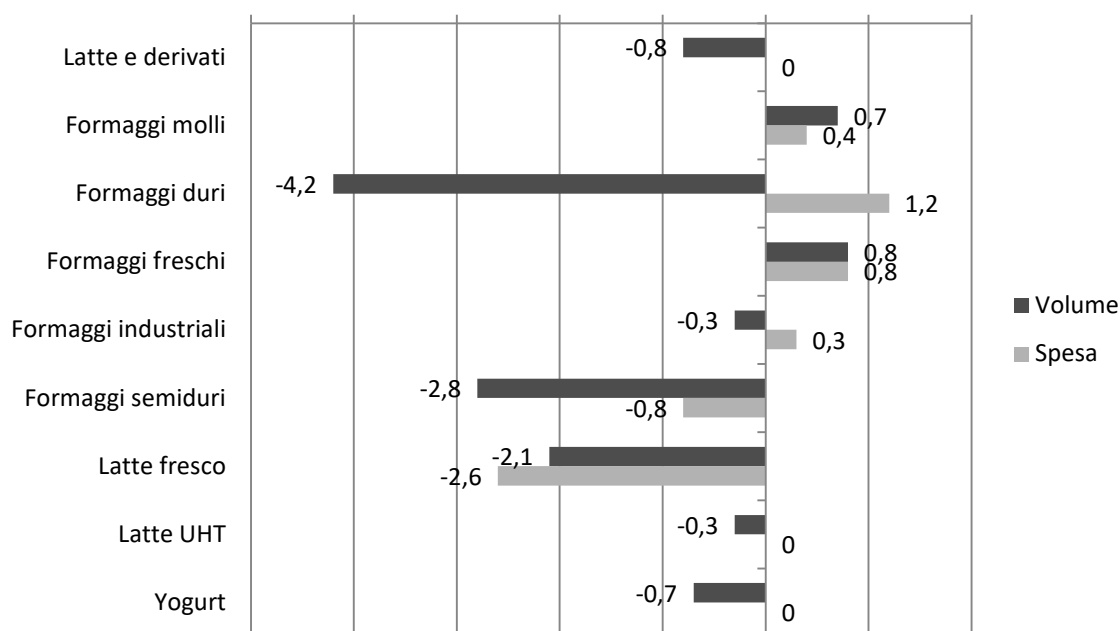
Nello studio di Evans *et al.* (2015) il 60% degli intervistati ha dichiarato di aver consumato formaggi dopo la loro data di scadenza e più del 70% ha ammesso di averli conservati per più di due giorni dopo l'acquisto al banco o l'apertura della confezione. Alcune persone erano preoccupate dal potenziale spreco legato al rispetto delle date di scadenza e questa percezione può aumentare il rischio di listeriosi causata da alimenti che sono stati conservati a lungo, poiché alcuni alimenti RTE possono consentire la presenza di *Listeria monocytogenes* fino a 100 UFC/g fino al momento del consumo che è previsto entro la data di scadenza e qualora la conservazione sia prolungata il criterio non è più garantito.

Negli studi viene ignorata la possibile crescita del microrganismo tra l'acquisto e la conservazione refrigerata casalinga poiché non ci sono abbastanza dati a riguardo e poiché si presume che il tempo che intercorre sia il più breve possibile, mentre generalmente i campioni che vengono prelevati vengono conservati in condizioni controllate fino all'analisi per evitare il deterioramento del prodotto e la non affidabilità dei risultati che si ottengono (EFSA, 2018).

### 3.3 Abitudini alimentari e consumo

Negli ultimi anni è stato registrato un aumento del consumo di alimenti RTE a causa del cambiamento delle abitudini della popolazione: la frequenza e la dimensione delle porzioni si sono ampliate in tutte le fasce d'età e ciò viene considerato come un fattore di rischio poiché è accertato che gli alimenti RTE possano essere veicolo di microrganismi patogeni tra cui *Listeria monocytogenes*, quindi l'aumento del consumo di tali alimenti viene identificato come un aumento dell'esposizione al patogeno. Sia il numero di porzioni che la dimensione impattano direttamente sul numero di casi di listeriosi invasiva all'anno: se i primi raddoppiano, anche il numero di casi aumenta di un fattore due.

Tra gli alimenti RTE che hanno subito un aumento dei consumi ci sono i formaggi, principalmente quelli freschi e molli. Infatti secondo i dati CLAL aggiornati ad inizio 2020 in Unione europea i consumi di formaggi sono aumentati dello 0,77% nel 2018 rispetto all'anno precedente.



**Figura 9:** acquisti domestici di prodotti lattiero-caseari 2019 vs 2018, variazioni %

La dimensione della porzione è definita come la porzione di alimento espressa in grammi consumata in un pasto; per quanto riguarda i formaggi e altri prodotti alimentari la dimensione di una porzione considerata nelle analisi è standardizzata sulla base di dati derivanti dal database del consumo alimentare dell'EFSA e FoodEx, per evitare la variabilità dovuta al gruppo di consumatori. Inoltre, siccome un individuo in un giorno può consumare più volte uno stesso alimento, è bene stimare la dimensione della porzione come la media della quantità totale di tale alimento consumata in un giorno.

Per la valutazione dell'esposizione al pericolo, il numero di porzioni fa riferimento al totale delle porzioni di alimento consumate in un anno da una popolazione o una sottopopolazione più esposta al rischio. Come per la dimensione della porzione, è necessario stimare il numero di porzioni utilizzando dati ufficiali dell'EFSA (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2017).

Age group (years)	Cheese		Age group (years)	Soft and semi-soft cheese	
	Soft and semi-soft cheese			F	M
	F	M			
1-4	21	20	1-4	232	202
5-14	27	43	5-14	475	475
15-24	40	43	15-24	679	593
25-44	48	45	25-44	2,296	2,033
45-64	46	44	45-64	2,455	2,558
65-74	32	40	65-74	1,049	1,054
≥ 75	36	41	≥ 75	1,334	1,183
			<b>Mean(all ages)</b>	<b>8,520</b>	<b>8,098</b>

**Figura 10:** per le diverse fasce d'età e generi: porzione media di formaggio in grammi (a sinistra) e numero medio di porzioni in milioni all'anno (a destra) in UE

Lo stile di vita della popolazione è cambiato negli anni anche grazie all'ampia gamma di prodotti che si trova sul mercato e alla spinta a comprare indotta dalle tecniche pubblicitarie innovative: le famiglie comprano di più di quanto riescono a consumare prima della data di scadenza o comprano alimenti vicini al termine della shelf-life perché più economici e queste abitudini aumentano la probabilità che gli alimenti vadano incontro a deterioramento e, se consumati, possano aumentare il rischio di generare malattie tossinfettive. Le abitudini sono molto diverse tra le varie popolazioni e tra i singoli individui: per esempio il consumo abituale elevato da parte delle donne ispaniche in gravidanza di queso fresco messicano, prodotto da latte crudo, ha causato un numero elevato di casi di listeriosi negli Stati Uniti negli anni (Jackson *et al.*, 2010). Relativamente al consumo di formaggi è opportuno tenere in considerazione la presenza di alcune restrizioni dietetiche, raccomandazioni o consigli rivolti alle diverse categorie di popolazione: agli anziani viene consigliato il consumo di formaggi e latticini per gli effetti positivi che possono avere sulla salute come il contrasto dell'insorgenza dell'osteoporosi; alle donne in gravidanza viene detto di consumare formaggi poiché contengono calcio e proteine ma evitare quelli molli e prodotti da latte crudo; per le persone immunocompromesse spesso non ci sono indicazioni dietetiche specifiche per quanto riguarda il consumo di formaggi. Ciò influenza la frequenza e la dimensione delle porzioni e la relazione dose-risposta che descrivere la probabilità di insorgenza della malattia in funzione dell'esposizione cioè quante cellule entrano in contatto con l'ospite.

### 3.4 Contaminazione crociata tra alimenti e manipolazione

La contaminazione crociata è uno dei fattori di rischio di insorgenza della listeriosi più frequente: *Listeria monocytogenes* può trasmettersi direttamente o indirettamente da un alimento all'altro, sia che siano alimenti cotti che crudi, anche tramite utensili contaminati o le mani del produttore, venditore e consumatore finale.

Lo studio di Heiman *et al.* (2016) mette in evidenza la possibilità di contaminazione tra diversi tipi di formaggio: *Listeria monocytogenes* è stata isolata da vari formaggi a pasta molle e semi-



molle che erano stati a contatto nel punto vendita o nel frigorifero domestico e da alcuni formaggi che erano stati tagliati e riconfezionati dal distributore. Il patogeno ha causato un outbreak multinazionale e tra le persone contaminate tre adulti sono morti e tra le nove donne in gravidanza che hanno contratto la malattia, una di esse ha abortito e un bambino è nato morto. L'età media degli individui che si sono ammalati era di 77 anni.

In Germania è stato registrato un caso letale di listeriosi causato dal consumo di formaggio contaminato: il patogeno è stato isolato in alte concentrazioni in tre alimenti RTE a contatto nel frigorifero domestico del paziente colpito (Koch *et al.*, 2010).

Le pratiche di manipolazione dell'alimento da parte del consumatore finale hanno un elevato impatto sulla contaminazione da *Listeria monocytogenes*.

Evans *et al.* (2015) hanno riportato i risultati relativi alla rilevazione di *Listeria monocytogenes* da vari siti a livello domestico come la maniglia del frigorifero, il miscelatore del rubinetto, taglieri, coltelli e spugne: sull'1% delle maniglie dei frigoriferi e dei rubinetti studiati è stata riscontrata la presenza di *Listeria monocytogenes* che si presume derivi dalla manipolazione di alimenti contaminati da parte del consumatore.

Il cibo può essere contaminato a livello domestico: un esempio può essere la conservazione per lungo tempo di un formaggio aperto e lasciato scoperto in condizioni non adeguate quindi eventualmente a contatto con altri tipi di alimento, in luoghi non adatti alla conservazione o posizionato in maniera casuale nel frigorifero domestico (EFSA, 2018).

### 3.5 Trasmissione ambientale

*Listeria monocytogenes* è in grado di persistere negli ambienti di trasformazione alimentare grazie alla sua capacità di adattarsi a molte condizioni estreme e produrre biofilm; la sua presenza è favorita quando vengono mantenute scarse condizioni di igiene dell'ambiente, degli impianti di lavorazione e del personale.

Anche se a livello molto basso, sono state riscontrate delle positività per il batterio patogeno in campionamenti effettuati in cisterne di trasporto e stoccaggio della materia prima latte (Delhalle *et al.*, 2012). Inoltre sono stati registrati alcuni tamponi positivi derivanti dalle analisi sugli stivali e abiti dei lavoratori, i quali hanno trasferito così l'agente patogeno all'ambiente di lavorazione del latte (Schoder *et al.*, 2011).

Lo studio di Lee *et al.* (2017) ha dimostrato come *Listeria monocytogenes* sia in grado di resistere per lungo tempo non solo in luoghi come serbatoi di stoccaggio, nastri trasportatori e ambienti di nicchia a livello dell'azienda lattiero-casearia produttrice ma anche in siti diversi come su carrelli dove ci possono essere elementi che favoriscono lo sviluppo del batterio e su superfici dove si possono accumulare residui di cibo. Gli autori hanno evidenziato la capacità di *Listeria monocytogenes* di produrre biofilm su diverse superfici quali polistirene e acciaio inossidabile a diverse temperature.

Questo fattore di rischio è da tenere in considerazione poiché è stata riscontrata anche una certa resistenza ai disinfettanti da parte del patogeno per cui non è semplice garantire l'assenza del

microrganismo specialmente su superfici ruvide e in ambienti di nicchia che possono venire a contatto con l'alimento.

La contaminazione del formaggio da *Listeria monocytogenes* può derivare dagli ambienti esterni dall'impianto di trasformazione dei prodotti lattiero-caseari come riscontrato da McIntyre et al. (2015): ispezioni e tamponi ambientali hanno rilevato la presenza del patogeno nelle aree al di fuori della lavorazione casearia che ha poi contaminato l'alimento che era prodotto da latte di buona qualità e che aveva subito un trattamento di pastorizzazione efficace.

La contaminazione può avvenire anche tramite contatto diretto o indiretto con animali come uccelli o roditori o a causa di acque inquinate, infatti *Listeria monocytogenes*, come detto, è un microrganismo ubiquitario per cui le attenzioni non si devono focalizzare solo sulla materia prima e il processo produttivo ma su tutto l'ecosistema circostante.

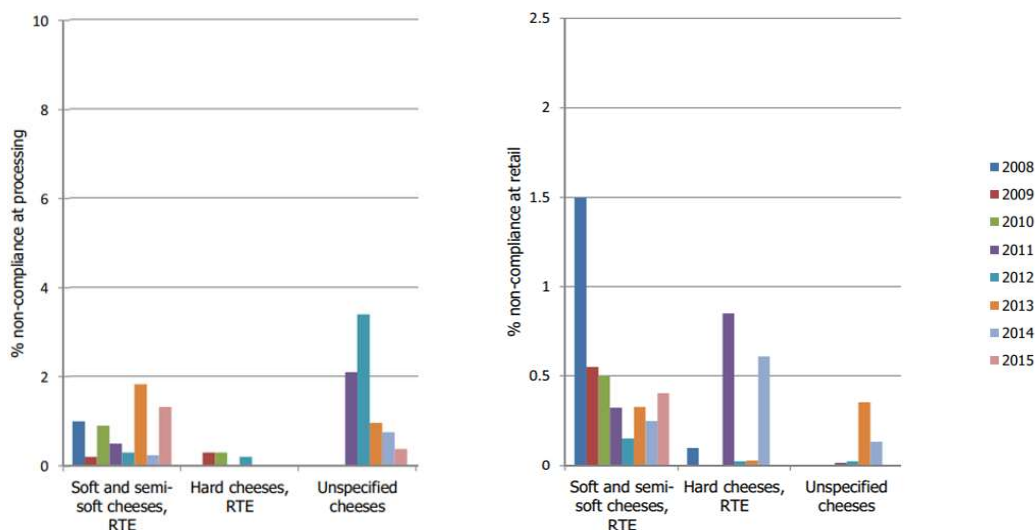
### **3.6 Prevalenza e concentrazione**

La prevalenza, come numero di campioni positivi a *Listeria monocytogenes*, dipende dalla dimensione del campione e dall'entità della contaminazione del lotto: per esempio se il lotto è contaminato ad un livello maggiore a 1 UFC/g c'è un'alta probabilità che ogni campione da 25 g si riveli positivo alla *Listeria monocytogenes*; d'altro canto se le dimensioni del campione fossero solo di 1 g, alcuni campioni risulterebbero negativi (World Health Organization 2004).

La prevalenza influenza direttamente l'incidenza della listeriosi: se la prevalenza raddoppia, anche l'incidenza raddoppia.

Inoltre, per grandi quantità di prodotto la prevalenza è correlata con la concentrazione e la stima della prevalenza dipende dal livello di contaminazione e dalla dimensione del campione.

La prevalenza varia anche in funzione dello stadio della catena di produzione-consumo, del clima e dello stato di salute dei produttori e dei consumatori. Per i formaggi, prodotti che consentono la crescita di *Listeria monocytogenes*, si può facilmente rilevare una bassa prevalenza di contaminazione del prodotto sia nel punto di produzione che nel punto vendita poiché la contaminazione iniziale può essere stata bassa ma è necessario considerare che successivamente il patogeno può svilupparsi.



**Figura 11:** prevalenza di *Listeria monocytogenes* in alcuni tipi di formaggio durante la fase di elaborazione e al dettaglio

Considerando il campionamento in fase di elaborazione i dati EFSA (EFSA, 2019) riportano nei formaggi a pasta molle e semi-molle una prevalenza tra 0,2 e 1,8% e per i formaggi a pasta dura valori tra 0 e 0,3%; in fase di campionamento al dettaglio per i formaggi a pasta molle è stata registrata una prevalenza inferiore a 0,6% e per i formaggi a pasta dura inferiore a 0,3%: generalmente i formaggi a pasta molle e semi-molle hanno un livello più elevato di non conformità rispetto ai formaggi a pasta dura. Il fatto che in fase di campionamento al dettaglio siano stati registrati valori di non conformità inferiori all'1% non assicura la totale sicurezza poiché, tenendo conto del consumo totale, si possono avere molte porzioni contenenti più di 100 UFC/g. Infatti per la valutazione della prevalenza di *Listeria monocytogenes* nei formaggi sul mercato generalmente viene considerata la concentrazione iniziale al momento del campionamento, cioè nel momento della vendita al dettaglio, e si prevede la crescita del microrganismo durante la distribuzione e la conservazione (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2017).

I dati EFSA riportano che lo 0,5% (circa 1 su 200 campioni) dei formaggi a pasta molle e semi-molle presi sotto esame nell'analisi sulla prevalenza del 2010-2011 risultavano contaminati da *Listeria monocytogenes* alla fine della shelf-life, ma solo lo 0,06% dei campioni superava il limite di 100 UFC/g definito dal regolamento 2073/2005. Inoltre è stata registrata una prevalenza maggiore nei formaggi a fette rispetto a quelli non affettati: l'effetto del taglio può aumentare il numero di casi (EFSA, 2013).

La concentrazione media di *Listeria monocytogenes* nei prodotti lattiero-caseari riportata nelle notifiche RASFF negli ultimi anni è di 2,61 logUFC/g e sono stati registrati dei massimi di concentrazione di 6,25 logUFC/g in alcuni prodotti: la concentrazione era superiore a 2 logUFC/g nel 65% dei casi notificati (EFSA, 2018).

Alcuni elementi che influenzano la contaminazione e la prevalenza di *Listeria monocytogenes* di alcuni prodotti RTE come i formaggi sono l'ambiente di lavorazione che comprende programmi di pulizia e test per validarli e presenza/assenza del piano HACCP, le pratiche di preparazione che comprendono il tipo di lavorazione e l'uso di un trattamento letale seguito eventualmente da esposizione come affettatura e confezionamento, le caratteristiche del prodotto come sale, pH, imballaggio e le condizioni di conservazione ovvero tempo e temperatura.

### 3.7 Virulenza del ceppo batterico

Sulla base dei 14 antigeni somatici O termolabili e di quelli flagellari H, sono stati identificati 12 sierotipi diversi di *Listeria monocytogenes*, ma il 95% degli isolati umani appartiene ai sierotipi 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b.

Un tipo di formaggio morbido contaminato con il sierotipo 1/2a di *Listeria monocytogenes* ha causato un focolaio di dieci casi in Svizzera: otto casi erano pazienti anziani immunocompromessi, gli altri due riguardavano donne in gravidanza che hanno abortito; questo caso di batteriemia ha avuto esito fatale per tre persone infette.

In Giappone il consumo di un formaggio semi-molle contaminato da *Listeria monocytogenes* ha causato 86 casi di infezione di cui 38 manifestati con sintomi clinici come gastroenterite e raffreddore: tutti gli isolati del microrganismo dai pazienti erano appartenenti al sierotipo 1/2b (Choi *et al.*, 2016). I casi di listeriosi registrati in un anno in Belgio sono causati per il 55% dal sierotipo 1/2a e per il 42,5% dal sierotipo 4b.

I ceppi più diffusi e virulenti caratterizzati dopo un outbreak causato dal consumo di formaggi molli come Taleggio e Gorgonzola in Lombardia appartenevano ai sierotipi 1/2a e 4b (Amato *et al.*, 2017).

Acciari *et al.* (2011) hanno caratterizzato i ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da alcuni formaggi a pasta molle e semi-molle consumati comunemente in Italia: i risultati hanno evidenziato la prevalenza dei sierotipi 1/2a, 1/2b e 1/2c e la resistenza agli antimicrobici come oxacillina (OX), clindamicina (CC), lincomicina (L) e miscele di essi.

Tipo formaggio	Sierotipo (%)				Profili di resistenza (%)			
	1/2 a	1/2 b	1/2 c	L	OX	OX CC	OX CC L	OX L
Asiago (n = 1)	–	–	100	–	–	–	100	–
Brie (n = 3)	66,7	33,3	–	–	–	–	100	–
Crescenza (n = 1)	–	–	100	–	–	–	100	–
Gorgonzola (n = 21)	76,2	–	23,8	4,8	–	4,8	81	9,5
Taleggio (n = 21)	85,7	–	14,3	–	23,8	14,3	52,4	9,5
Totale complessivo	76,6	2,1	21,3	2,1	10,6	8,5	70,2	8,5

**Figura 12:** sierotipi principali e profili di resistenza rilevati in alcuni formaggi da Acciari *et al.* (2011)

Oltre a diversi sierotipi di *Listeria monocytogenes* riconosciuti come i principali agenti di malattia, sono stati individuati anche alcuni complessi clonali (CC) con differenti livelli di virulenza e patogenicità: 12 CC rappresentano circa l'80% degli isolati di *Listeria monocytogenes*. Generalmente i cloni isolati dagli alimenti (principalmente CC121 e CC9) sono diversi e meno virulenti rispetto ai cloni clinici associati alle infezioni (CC1, CC2, CC4, CC6). I ceppi isolati dai casi clinici sono stati sequenziati e talvolta è stato rilevato il legame tra i complessi clonali e la loro origine alimentare: questi CC erano più frequentemente associati a persone immunocompromesse.

Con i nuovi metodi di identificazione e tipizzazione come il sequenziamento dell'intero genoma (WGS), sono stati caratterizzati vari sierogruppi che comprendono i sierotipi rilevati

precedentemente tramite elettroforesi su gel a campo pulsato (PFGE) e la sierotipizzazione convenzionale:

- IIa che comprende i sierotipi 1/2a e 3a
- IIb che comprende i sierotipi 1/2b e 3b
- IIc che comprende i sierotipi 1/2c e 3c
- IVb che comprende i sierotipi 4b e 4d,e

Secondo quanto registrato dal sistema di sorveglianza europeo il sierogruppo IVb è quello che causa un maggior numero di esiti fatali nella popolazione anziana e il numero di casi appare in aumento.

La presenza di più isolati di *Listeria monocytogenes* negli alimenti può portare ad un aumento dei casi di infezione a causa degli effetti sinergici sul potenziale di virulenza che si possono instaurare e quanto più i ceppi sono virulenti, tanto più sono pericolosi principalmente per la popolazione più fragile (EFSA, 2018).

La virulenza di *Listeria monocytogenes* viene considerata un fattore di rischio per la malattia poiché variando in funzione di vari fattori, può aumentare la probabilità di comparsa della listeriosi umana e può aumentare la vulnerabilità del consumatore: temperatura, pH, stress osmotico, la natura e le caratteristiche della materia prima latte hanno un'incidenza notevole sulla virulenza del patogeno (Pricope-Ciolacu *et al.*, 2013).

La virulenza del microrganismo non dipende solo dai fattori ambientali e dalle caratteristiche dell'alimento ma anche dalla capacità di esso di resistere alle condizioni che trova nel passaggio attraverso lo stomaco dell'ospite e successivamente di attraversare la barriera intestinale, infatti alcuni ceppi riescono ad entrare nelle cellule epiteliali umane grazie all'interazione che si instaura tra internaline specifiche della superficie batterica e i rispettivi recettori delle cellule ospiti. Tramite mutazioni genetiche la virulenza può essere attenuata o incrementata (Pouillot *et al.*, 2015).

### **3.8 Sistemi di sorveglianza**

Nonostante ad oggi i sistemi di sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare siano molto avanzati rispetto al passato, ci sono ancora alcuni punti che possono essere migliorati. Il sistema di sorveglianza della listeriosi umana è stato istituito in Unione europea nel 2008 e negli anni i Paesi membri hanno mirato a migliorare gli organismi di controllo nazionali, mentre per quanto riguarda il sistema di monitoraggio della listeriosi specificatamente per le donne in gravidanza è nato pochi anni fa per cui sono disponibili solo pochi dati che possono essere valutati. Nei Paesi in cui il sistema di sorveglianza nazionale è migliorato sono stati registrati più casi di malattia, poiché il sistema ha permesso di identificarli meglio dal punto di vista clinico e coprire meglio il territorio. Il miglioramento del sistema di sorveglianza influenza direttamente il tasso di incidenza della listeriosi umana: se lo sviluppo del sistema è di un fattore due, raddoppiano i casi di listeriosi registrati. Il sistema di sorveglianza nazionale riporta il numero di casi di listeriosi accertati che può essere inferiore a quello dei casi effettivamente presenti; la sottostima può

essere dovuta ai casi sintomatici che non contattano i servizi sanitari e agli individui infetti ai quali la malattia viene diagnosticata in modo errato.

Ad oggi i casi di malattia e gli isolati di *Listeria monocytogenes* sono sotto sorveglianza epidemiologica e microbiologica dal programma europeo TESSy che opera raccogliendo, analizzando e diffondendo i dati relativi alle malattie di origine alimentare.

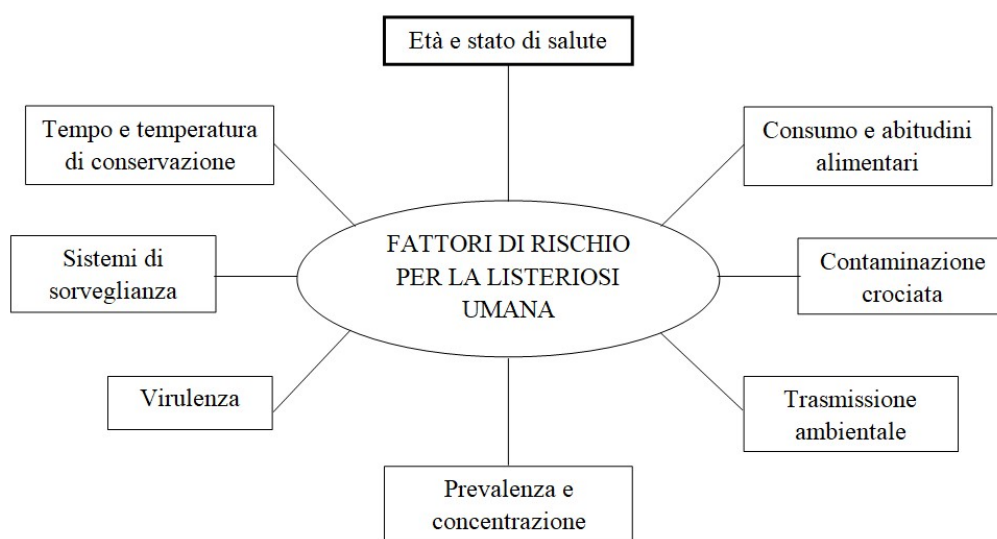
Con un sistema di sorveglianza evoluto si registrano più casi di listeriosi, ma anche se esso non agisce in maniera efficace potrebbe aumentare la probabilità di comparsa della listeriosi nella popolazione e in primo luogo nelle categorie più a rischio.

I metodi di controllo della catena alimentare spesso riguardano la conformità dei prodotti durante la fase di elaborazione e hanno lo scopo di avviare un allarme rapido e misure di controllo, ma non fanno riferimento ai rischi per popolazioni specifiche in relazione all'introduzione di determinati alimenti e non riguardano la prevalenza del microrganismo nel prodotto al dettaglio che potrebbe superare i livelli di accettabilità (Boelaert *et al.*, 2016). Un'altra problematica è rappresentata dal fatto che i dati annuali riportati dai sistemi di sorveglianza sono influenzati dalle relazioni tra gli Stati membri e anche all'interno di uno Stato se cambiano le strategie di campionamento.

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Sono stati identificati i principali fattori di rischio che possono aumentare la probabilità d'insorgenza della listeriosi specialmente per le categorie di popolazione più vulnerabili. Tali fattori di rischio e altri che non rientrano nei principali possono agire da soli o in combinazione e l'effetto di alcuni può essere valutato solo indirettamente come presenza del patogeno al momento del consumo. Sebbene il livello ideale, cioè la prevalenza zero e zero casi di malattia, non possa essere raggiunto, è opportuno prestare attenzione ai fattori di rischio per abbassare la probabilità di contaminazione da *Listeria monocytogenes* e l'insorgenza dell'infezione.

L'incidenza dei vari fattori di rischio non è ugualmente rappresentata anche perché i dati non sono sempre disponibili e soddisfacenti in funzione dello studio che si vuole fare. È difficile ottenere i dati relativi a tutte le caratteristiche e le situazioni in cui si può trovare l'alimento, il consumatore e il patogeno. Tramite un'analisi di importanza basata sulla valutazione quantitativa del rischio microbiologico generica per *Listeria monocytogenes*, sull'evidenza empirica e sul parere di esperti, sono stati valutati i fattori che hanno un maggiore impatto sul numero di casi di listeriosi: tra i fattori che hanno un'elevata probabilità (66-90%) di contribuire all'andamento dei casi e ai tassi di incidenza si ha l'aumento degli individui nella fascia di età avanzata e delle persone sensibili come donne in gravidanza con età tra 25 e 44 anni e persone con sistema immunitario compromesso. I fattori con probabilità di influenza intermedia (33-66%) comprendono l'aumento del consumo di alimenti RTE ovvero il numero di porzioni per persona e il miglioramento dei sistemi di sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare tra cui la listeriosi. La concentrazione e la prevalenza di *Listeria monocytogenes* nei formaggi, la virulenza del patogeno e tempo e temperatura di conservazione a livello del consumatore sono fattori importanti da tenere in considerazione ma contribuiscono meno all'aumento di casi di listeriosi e non si hanno informazioni complete a riguardo (EFSA, 2018).



**Figura 13:** schema riassuntivo dei principali fattori di rischio associati all'insorgenza della listeriosi umana

Alcuni fattori di rischio identificati sono correlati all'ospite (età, stato di salute), alcuni all'alimento (prevalenza e concentrazione del microrganismo, tempo e temperature di conservazione, consumo, contaminazione crociata e trasmissione ambientale), altri sono correlati al batterio (virulenza) e si deve tenere in considerazione anche il sistema di sorveglianza attivo. Essere un consumatore vulnerabile, è il fattore di rischio più importante da considerare per studiare la possibilità di contrarre la listeriosi. Queste categorie di popolazione sono più soggette a contrarre l'infezione, infatti i dati hanno dimostrato una maggior incidenza e tassi di letalità più elevati rispetto alle altre categorie di consumatori. Oltre ad una maggiore informazione per essi relativa ai rischi e alle abitudini di consumo è necessario mantenere sotto controllo tutti gli altri fattori di rischio che possono essere fondamentali per fare in modo che chi è più suscettibile non si ammali.

Dai dati risulta che la temperatura di stoccaggio non corretta aumenta il rischio di venire a contatto con *Listeria monocytogenes* consumando formaggi di vario tipo. L'incidenza della listeriosi umana è fortemente influenzata dalle condizioni di conservazione (soprattutto tempo e temperatura) a livello del consumatore finale. I risultati indicano che la percentuale di comportamenti non sicuri nelle categorie di consumatori a rischio è elevata e molto spesso è correlata all'età. *Listeria monocytogenes* può crescere anche a temperature di refrigerazione per cui è molto importante sia controllare che la temperatura rientri nei valori raccomandati sia che i prodotti vengano consumati prima della data di scadenza poiché in condizioni non corrette la probabilità di insorgenza della listeriosi può raddoppiare.

L'integrità della catena del freddo e i metodi di conservazione si sono rivelati importanti e sono ancora aree di miglioramento per ridurre il rischio di listeriosi umana principalmente per i consumatori vulnerabili. È necessario controllare la temperatura del frigorifero periodicamente; per garantire maggior sicurezza dovrebbe essere mantenuta a valori massimi tra 4,3 e 5,5°C (Lamboni *et al.*, 2014). Studiando uno scenario dove *Listeria monocytogenes* non cresceva nel prodotto, il numero totale dei casi di infezione è diminuito del 37%. La crescita dipende principalmente dalla temperatura e dal tempo di conservazione dell'alimento dopo la vendita al dettaglio, perciò controllando questi fattori è possibile ridurre il rischio di contrarre la listeriosi quindi diminuire i casi di infezione (EFSA, 2018).

Le abitudini dei consumatori possono avere dei riscontri sulla loro stessa salute: per esempio le tendenze della società ad una maggior sostenibilità e un minor spreco alimentare possono influenzare il cambiamento della qualità e sicurezza dei prodotti in senso negativo.

Lo stile di vita di molte persone è cambiato, volto all'aumento del consumo di alimenti pronti e come affermato da Evans *et al.* (2016), per evitare che si abbia una conservazione prolungata dei prodotti dopo l'apertura, principalmente per chi vive da solo o per gli anziani che generalmente consumano dosi inferiori, a livello di industria si potrebbero progettare confezioni sicure e di varie dimensioni per gli alimenti, in modo tale che siano adeguate per le varie classi di consumatori e diminuisca lo spreco, il rischio di deterioramento e di insorgenza di malattie dovute al consumo di tali alimenti.

Risulta importante il controllo dell'igiene e l'uso di una manipolazione sicura quando si è a contatto con alimenti che rappresentano una potenziale fonte di microrganismi pericolosi per l'uomo: è stato evidenziato che gli ambienti, le superfici, gli oggetti e le mani del consumatore possono essere mezzi di trasmissione di *Listeria monocytogenes* ai formaggi che, non subendo poi ulteriori trattamenti di risanamento, lo trasmettono all'uomo.



I fattori di rischio identificati possono essere validi elementi da tenere in considerazione quando si mette a punto una valutazione del rischio da *Listeria monocytogenes* negli alimenti RTE e in particolare nei formaggi.

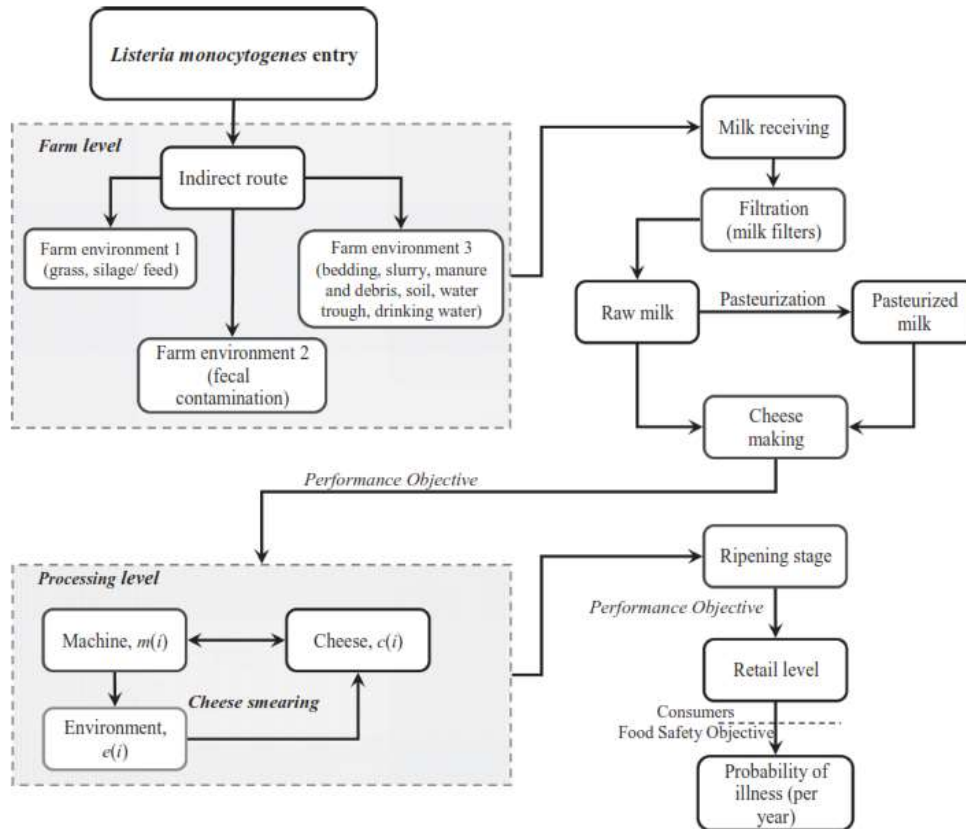
Nella maggior parte delle valutazioni del rischio microbiologico il deterioramento non viene preso in considerazione e ciò può causare stime del rischio errate poiché le condizioni che permettono il raggiungimento di livelli critici del patogeno favoriscono il deterioramento e viceversa. Però il deterioramento può essere un segnale che riduce la probabilità di consumo di alimenti considerati non accettabili da parte del consumatore e nei quali probabilmente si sono sviluppati microrganismi indesiderati (EFSA, 2018).

L'attenzione alla contaminazione da *Listeria monocytogenes* nei prodotti RTE tra cui i formaggi deve avvenire in tutte le fasi della filiera: a livello industriale è necessario che venga messo in atto un piano HACCP e siano rispettate le buone prassi igieniche (GHP) per evitare che gli ambienti, le attrezzature e il personale contaminino i prodotti. Per la costruzione di un piano HACCP è necessario definire i punti critici di controllo per prevenire, eliminare o controllare il pericolo nel prodotto finale: per esempio per un formaggio a pasta molle prodotto con latte pastorizzato possono essere identificati come CCP le caratteristiche dell'ambiente di maturazione, la fase di produzione e di conservazione prima del trasporto. Inoltre possono essere fissati dei limiti critici relativi ai CCP per verificare la loro efficacia: dovrebbero essere monitorati la qualità ambientale, il livello di contaminazione del latte e la temperatura di trasporto del formaggio affinché non venga favorito lo sviluppo di *Listeria monocytogenes* (Lamboni *et al.*, 2014). Possono essere fissati degli obiettivi di performance durante il processo produttivo che permettono di controllare la massima concentrazione e/o frequenza del pericolo nel prodotto in un determinato step della catena alimentare (Tiwari *et al.*, 2015).

Le migliori condizioni igieniche devono garantire una riduzione della presenza di *Listeria monocytogenes* altrimenti si potrebbe creare un ecosistema con livelli più bassi di microflora concorrente e ciò causerebbe una crescita più veloce del patogeno e quindi un rischio maggiore. Analisi e controlli più approfonditi devono essere messi in atto quando si producono formaggi tradizionali con latte crudo dove il patogeno si può sviluppare in maniera ottimale e causare poi focolai nella popolazione.

Per controllare meglio la massima concentrazione e/o frequenza del pericolo possono essere fissati degli obiettivi di sicurezza alimentare applicabili al momento del consumo.

Un ruolo fondamentale è svolto dal consumatore finale: vi è un'ampia variabilità all'interno dei gruppi di consumatori ed è difficile generalizzare sui comportamenti di manipolazione degli alimenti nei diversi Stati membri e su come ciò possa contribuire alle tendenze della listeriosi umana, per cui è necessario non solo aumentare le conoscenze del consumatore, ma anche trovare delle strategie per cambiare le sue abitudini per educarlo ad una maggior sicurezza, poiché è noto che la maggior parte delle contaminazioni avvengono a livello domestico a causa di una scarsa o mancata attenzione verso quelle azioni e parametri che aumentano il rischio di introdurre o favorire la crescita del patogeno. Per i gruppi di popolazione a rischio le misure mirate includono l'evitare alimenti specifici e il cambiamento delle abitudini alimentari e della qualità della vita associata alle loro preferenze alimentari.



**Figura 14:** rappresentazione schematica delle fasi in cui può avvenire la contaminazione del formaggio da *Listeria monocytogenes*

#### 4.1 Relazione dose-risposta

Per una valutazione più approfondita, se ci sono dati disponibili, si possono tenere in considerazione i modelli dose-risposta.

Il numero di microrganismi che entra nel tratto digestivo per esposizione può essere espresso come un numero medio di particelle funzionali dell'organismo patogeno (o più precisamente la concentrazione in UFC/g del patogeno moltiplicata per la porzione in grammi) e rappresenta la dose cioè una misura quantitativa dell'intensità dell'esposizione; ad una certa dose, si verificano determinati effetti nell'ospite e la frequenza di essi nella popolazione esposta costituisce la risposta che può essere più o meno ben definita, ma generalmente non c'è una relazione lineare e precisa tra le dimensioni della dose e la frequenza dell'effetto biologico che produce. Inoltre, solitamente i microrganismi patogeni producono un'ampia varietà di effetti o condizioni all'interno dell'ospite per cui viene definita una serie di relazioni dose-risposta che descrive il rapporto tra gli effetti biologici e l'entità della dose. Per *Listeria monocytogenes* gli effetti comunemente considerati sono l'infezione, varie forme di morbilità e morte (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2017).

La risposta della popolazione esposta, in termini di durata e gravità, può essere variabile: la variabilità dipende soprattutto dalle caratteristiche del ceppo di *Listeria monocytogenes* come

virulenza e numero di cellule ingerite ma anche dallo stato immunitario dell'ospite e gli attributi dell'alimento che possono alterare lo stato microbico.

La relazione dose-risposta viene sviluppata sulla base del parere di esperti e di dati epidemiologici sull'uomo; alcuni modelli descrivono l'infezione come un processo deterministico, altri come un processo stocastico.

La visione stocastica si fonda sul presupposto che ciascuna cellula microbica agisca indipendentemente dalle altre e sia una potenziale causa di malattia, cioè che la dose minima infettiva sia un batterio, invece la visione deterministica presuppone che per ogni microrganismo sia presente una dose minima intrinseca, cioè un livello soglia al di sotto del quale non si osserva nessuna risposta, dove quindi il rischio è zero; tuttavia il livello di soglia, ovvero la dose minima, può variare tra gli individui di una popolazione.

I modelli dose-risposta possono anche differenziarsi in empirici o meccanicistici; potenzialmente i modelli meccanicistici sarebbero più flessibili poiché si concentrano su caratteristiche specifiche e potrebbero spiegare meglio l'interazione tra ospite, patogeno e alimento, però ad oggi ci sono stati pochi tentativi di sviluppo e non ne sono stati fatti su *Listeria monocytogenes*. Invece i modelli empirici considerano la tolleranza degli individui verso l'agente patogeno: le persone con tolleranza più bassa alla dose di esposizione subiscono gli effetti negativi, mentre chi ha alti livelli di tolleranza più facilmente non li mostra (Pérez-Rodriguez *et al.*, 2017).

Le relazioni dose-risposta basate su modelli empirici cercano di quantificare la concentrazione del patogeno (in questo caso il numero di cellule di *Listeria monocytogenes*) presente nell'alimento che ha causato la tossinfezione alimentare: quando si verifica una tossinfezione alimentare si cerca di recuperare l'alimento responsabile e si quantifica la dose ingerita da chi ha contratto la malattia o si approssima considerando la porzione media. In pochi casi è stata condotta un'indagine completa su un focolaio di listeriosi, a causa del prolungato periodo tra il consumo di un alimento contaminato e l'insorgenza della malattia e la natura sporadica della listeriosi rende anche le indagini molto difficili.

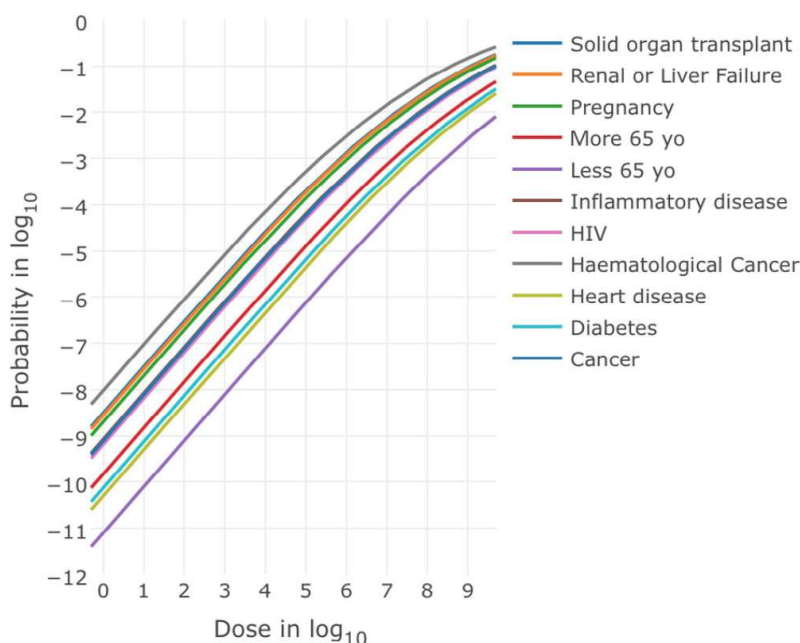
Il modello dose-risposta fornisce la relazione funzionale tra la probabilità che un individuo contragga la listeriosi e una dose specifica o il livello di esposizione ad un ceppo virulento di *Listeria monocytogenes*, più semplicemente la probabilità dell'insorgenza della malattia dovuta al consumo dell'alimento contaminato (Farber *et al.*, 1996).

Il modello dose-risposta potrebbe essere una fonte di incertezza sui risultati che si ottengono poiché dipende dai dati utilizzati nella valutazione dell'esposizione al pericolo e dai dati epidemiologici che possono variare in continuazione.

Inoltre i modelli devono tener conto delle differenze tra gli individui, per esempio nel meccanismo di infezione che può avvenire con recettori diversi e solitamente le funzioni matematiche descrivono la relazione dose-risposta sulla base di una popolazione e non la probabilità di malattia per un individuo specifico.

Data la bassa incidenza di listeriosi nella popolazione nonostante la frequenza esponenziale di *Listeria monocytogenes*, questi modelli presumono che le malattie derivino più frequentemente dall'esposizione a dosi elevate, superiori a  $10^5$  UFC/g, corrispondenti ad una concentrazione media superiore a 2000 UFC/g al momento del consumo se si considera una porzione standard di 50 g. Inoltre prevedono che alle basse dosi e ai tassi di malattia caratteristici della listeriosi, il tasso di infezione sia direttamente proporzionale alla dose (Buchanan *et al.*, 2017).

Alcuni studi (Chen *et al.*, 2011; Pouillot *et al.*, 2015) hanno basato il modello dose-risposta sui dati di prevalenza specifica del sottotipo, concentrazione negli alimenti e dati epidemiologici e di consumo per generare un valore  $r$ , cioè la probabilità che una cellula causi la malattia. In generale si ottengono varie equazioni che permettono di calcolare la probabilità di contrarre la listeriosi: i più utilizzati sono i modelli logaritmici che stimano un rischio più elevato per i ceppi altamente virulenti e gli individui sensibili.



**Figura 15:** rappresentazione del modello esponenziale della relazione dose-risposta (probabilità di gravi casi di listeriosi in funzione dell'esposizione) in diverse categorie di popolazione

La probabilità media che una singola cellula di *Listeria monocytogenes* causi la malattia, ovvero il valore  $r$ , può variare ampiamente in base all'ospite specifico a cui si fa riferimento, quindi lo stato di salute del consumatore è importante tanto quanto la concentrazione del patogeno nell'alimento consumato (EFSA, 2018). Lo studio di Pouillot *et al.* (2015) riporta i valori di  $r$  utilizzabili in un modello esponenziale non soglia ovvero dove basta un singolo microrganismo ingerito per causare un effetto avverso con una probabilità superiore a zero:  $10^{-12}$  -  $10^{-13}$  è l'intervallo di valori di  $r$  per la popolazione con maggior suscettibilità,  $10^{-13}$  -  $10^{-15}$  è quello per la popolazione generale; in entrambi i casi la probabilità di insorgenza della malattia ingerendo una piccola dose di batteri è bassa.

Nonostante esistano molti approcci come l'applicazione del modello Weibull-Gamma, per lo studio di *Listeria monocytogenes* viene preferito lo sviluppo di relazioni dose-risposta come Beta-Poisson oppure altre relazioni semplici basate sull'uso del modello esponenziale poiché riflette la media sulla base della popolazione considerando anche la variabilità, per esempio FDA e FSIS hanno riferito che il modello esponenziale è tra i migliori per descrivere la relazione tra dose e frequenza di morte.

## 4.2 Conoscenza del patogeno, della malattia e dei fattori di rischio

Spesso l'aspetto di conoscenza del patogeno, degli effetti della malattia e dei fattori di rischio che ne aumentano la probabilità di insorgenza è carente in tutte le categorie di popolazione. Varie indagini basate su questionari e interviste hanno dimostrato che più del 50% delle persone che ha risposto ai quesiti ha ammesso di non conoscere la malattia e non saper identificare gli alimenti ad alto rischio (Dalton *et al.*, 2011).

Lo studio di Preubel *et al.* (2015) dimostra che molte persone immunocompromesse non conoscevano i rischi e le vie di trasmissione della listeriosi, l'80% degli ammalati non aveva mai sentito parlare della malattia prima del proprio caso e solo il 6% delle persone immunocompromesse intervistate era a conoscenza dell'origine prevalentemente alimentare della malattia.

Non è raro che gli anziani non abbiano mai sentito parlare di *Listeria monocytogenes*, al contrario di altri patogeni come *Salmonella* ed *E.Coli* che sono noti e la maggior parte di loro non conosce i comportamenti da mettere in atto per abbassarne il rischio.

Per esempio lo studio di Evans *et al.* (2016) riporta la frequenza della conoscenza da parte degli anziani della durata di conservazione raccomandata per i prodotti a rischio contaminazione da *Listeria monocytogenes* dopo l'acquisto o l'apertura: la maggior parte degli intervistati ritiene che i formaggi a pasta molle acquistati al banco gastronomico possano essere conservati per più di due giorni, invece solitamente le raccomandazioni indicano una conservazione per un tempo inferiore poiché questi prodotti sono molto deperibili. Il tempo di conservazione degli alimenti aperti avanzati, anche se mantenuti in frigorifero, deve essere il più breve possibile.

Mediamente l'87% della popolazione non è a conoscenza delle temperature di conservazione raccomandate; il 72% della popolazione sa che le informazioni relative alla shelf-life sono i migliori indicatori per la sicurezza del prodotto ma spesso non le controllano o consumano i prodotti oltre la scadenza e ciò è stato e può essere pericoloso per la salute dei consumatori, soprattutto per i più vulnerabili.



**Figura 16:** frequenza di conoscenza della lunghezza di conservazione raccomandata dopo l'acquisto o l'apertura della confezione

È raccomandata la sensibilizzazione di tutte le parti interessate della catena alimentare riguardo al rischio di contrarre la listeriosi e al suo aumento previsto nel prossimo futuro: in primo luogo la sensibilizzazione deve riguardare le persone appartenenti a categorie di popolazione vulnerabili, seguite da persone che forniscono il cibo a suddette categorie, produttori di alimenti RTE, servizi di catering e autorità competenti. Chiunque venga a contatto con gli alimenti dovrebbe essere efficientemente istruito sulle buone pratiche igieniche per prevenire la contaminazione (EFSA, 2018).

La sensibilizzazione dovrebbe partire dal medico di base che copre un ruolo importante come fonte affidabile di informazioni sulla sicurezza alimentare poiché per esempio può dare consigli ai pazienti per evitare il consumo di alimenti a rischio e suggerimenti per agire con una manipolazione sicura. Spesso le persone più indifese, che rientrano in una delle categorie definite sono assistite da medici specializzati, per cui dovrebbe essere più facile fornire loro le informazioni relative ai rischi legati al consumo di determinati alimenti.

A volte le donne in gravidanza sono sottoposte ad una valutazione nutrizionale e viene consigliato loro l'uso di integratori, ma risulta ugualmente importante informarle sui rischi a cui possono andare incontro consumando alcuni tipi di alimenti comuni. Non tutte le donne frequentano le lezioni prenatali ma tutte ricevono assistenza medica durante il periodo di gravidanza e in queste occasioni è importante informarle e fornirle consulenza sulla sicurezza alimentare. Inoltre è necessario introdurre alcune raccomandazioni dietetiche rivolte alle persone immunocompromesse per prevenire le malattie di origine alimentare poiché, oltre ad essere naturalmente più esposti a causa dello stato di salute, secondo Preubel et al. (2015) non ci sono indicazioni specifiche che possano aiutare queste persone, eventualmente non a conoscenza dei rischi, a non contrarre malattie dovute al consumo di cibi che non sarebbero consigliati per loro. È opportuno inoltre che venga migliorato il monitoraggio e la comunicazione dei dati di sorveglianza relativamente al controllo da parte dell'OSA della conformità dei prodotti al regolamento 2073/2005 e allo sviluppo di questa malattia nella popolazione per ottimizzare la valutazione e la gestione del rischio ed evitare l'insorgenza di focolai.

Può risultare utile anche fornire maggiori informazioni relative alla sicurezza alimentare a livello di insegnamento scolastico.

## 5. CONCLUSIONI

*Listeria monocytogenes* è un microrganismo ubiquitario molto difficile da controllare; può crescere in alimenti che hanno caratteristiche molto diverse tra loro, riesce a sopravvivere in condizioni drastiche e può causare malattie gravi e morte; il rischio è rappresentato anche dal fatto che esistano ceppi con diversa virulenza. I principali prodotti a rischio sono gli alimenti RTE poiché spesso costituiscono un substrato di crescita idoneo per il microrganismo, vengono conservati in condizioni favorevoli per il suo sviluppo, non subiscono ulteriori trattamenti prima del consumo e vengono consumati da persone di tutte le fasce d'età.

L'elaborato ha evidenziato l'importanza di appartenere ad una categoria di consumatori vulnerabili per la contrazione della listeriosi umana tramite l'introduzione di alimenti RTE come i formaggi. Essere una persona anziana, una donna incinta o avere il sistema immunitario compromesso aumenta il rischio di contrarre la malattia poiché le difese immunitarie di queste categorie di popolazione sono indebolite e il patogeno riesce più facilmente a invadere i tessuti dell'ospite e moltiplicarsi causando una serie di effetti avversi.

Inoltre il rischio è incrementato dalla cattiva gestione degli alimenti da parte del consumatore finale: le pratiche scorrette di manipolazione, la conservazione per tempi e a temperature errate hanno causato e tutt'ora causano l'incremento del numero di casi di listeriosi registrati. Queste pratiche improprie vengono messe in atto, eventualmente in modo non volontario e consapevole, da tutte le categorie di popolazione ma in particolare in alcuni gruppi di persone, per esempio gli anziani cercano di non sprecare il cibo e non conoscendo il patogeno e la sua pericolosità si espongono maggiormente al rischio nel momento in cui consumano alimenti conservati per lungo tempo ed eventualmente in condizioni non corrette di temperatura e confezionamento.

Scrivere etichette più grandi e più chiare potrebbe essere una soluzione per poter gestire meglio gli alimenti.

Gli enti sanitari, tra cui gli istituti zooprofilattici, suggeriscono alcuni comportamenti corretti che il consumatore dovrebbe adottare; essi possono essere utili per osservare un'attenta igiene personale e delle attrezzature in cucina affinché diminuisca il rischio di tossinfezioni alimentari come la listeriosi. I consigli fanno riferimento a tutti i tipi di alimento, tra cui i formaggi; in particolare, per esempio, si suggerisce di:

- Leggere attentamente le etichette alimentari per garantire una corretta conservazione degli alimenti RTE rispettando la catena del freddo, per effettuare sempre il consumo entro la data di scadenza riportata e per consumare correttamente gli alimenti
- Eliminare la porzione non edibile dell'alimento, per esempio la crosta di alcuni tipi di formaggio
- Non acquistare alimenti privi di etichetta, soprattutto se a base di materie prime crude o non trattate termicamente
- Mantenere separati gli alimenti crudi da quelli cotti all'interno del frigorifero e durante la preparazione ed evitare di utilizzare gli stessi utensili (taglieri, coltelli) per la porzionatura
- Lavarsi bene le mani prima e dopo aver manipolato gli alimenti

FDA consiglia alle persone più vulnerabili come anziani, persone immunocompromesse e donne in gravidanza, di evitare il consumo di alimenti che supportano la crescita del patogeno pericoloso per la salute. È comunque importante che tali categorie di consumatori, qualora consumino tali prodotti, controllino quei fattori di rischio attribuiti all'alimento come il tempo e la temperatura di conservazione e la contaminazione crociata derivante da una manipolazione non sicura. L'aumento della sicurezza può essere garantito dal miglioramento dei sistemi di sorveglianza e di informazione che riflettono ad oggi un maggior numero di casi di malattia ma anche una migliore gestione di essa: i sistemi di sorveglianza devono essere in grado di individuare l'aumento dei casi ed eventuali focolai ed identificare le fonti di infezione grazie anche a tecnologie innovative che si stanno man mano integrando con i sistemi di controllo più avanzati. La comunicazione da parte di essi e di altre organizzazioni e singoli deve essere chiara, comprensibile e puntuale per fare in modo che le persone siano istruite sulla sicurezza alimentare e possano fare scelte consapevoli su ciò che consumano e prendere decisioni su comportamenti da attuare coscienti del fatto che possano avere riscontri sulla loro salute. Al giorno d'oggi le vie di comunicazione sono tante: dai social utilizzati quotidianamente dai più giovani, alla televisione che può trasmettere dati e consigli anche alle persone più anziane; le informazioni possono essere trasmesse tramite il supporto di video telematici e infografica. Si possono fare campagne pubblicitarie informative in luoghi pubblici frequentati da persone di ogni età. Un'altra strategia che può essere messa in atto per ridurre il rischio di contrarre la listeriosi dal consumo di alimenti è la progettazione di confezioni sicure e "tailor-made" per le varie categorie di consumatori in modo tale che non venga sprecato cibo e contemporaneamente non aumenti il rischio di contrarre malattie dovute al consumo di alimenti deteriorati.



## 6. BIBLIOGRAFIA

Acciari, V. A., Torresi, M., Migliorati, G., Di Giannatale, E., Semprini, P., Prencipe, V., *Caratterizzazione di ceppi Listeria monocytogenes isolati da formaggi a pasta molle e semi-molle prelevati nella regione Abruzzo*. Veterinaria Italiana, 2011, 47.1: 5-13.

Amato, E., Filippello, V., Gori, M., Lomonaco, S., Losio, M. N., Parisi, A., Huedo, P., Knabel, S. J., Pontello, M., *Identification of a major Listeria monocytogenes outbreak clone linked to soft cheese in Northern Italy–2009-2011*. BMC infectious diseases, 2017, 17.1: 342.

Awofisayo, A., Amar, C., Ruggles, R., Elson, R., Adak, G. K., Mook, P., Grant, K. A., *Pregnancy-associated listeriosis in England and Wales*. Epidemiology & Infection, 2015, 143.2: 249-256.

Boelaert, F., Amore, G., Van der Stede, Y., Hugas, M., *EU-wide monitoring of biological hazards along the food chain: achievements, challenges and EFSA vision for the future*. Current Opinion in Food Science, 2016, 12: 52-62.

Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., Whiting, R. C., *A review of Listeria monocytogenes: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments*. Food control, 2017, 75: 1-13.

Campagnollo, F. B., Gonzales-Barron, U., Cadavez, V. A. P., Sant'Ana, A. S., Shaffner, D. W., *Quantitative risk assessment of Listeria monocytogenes in traditional Minas cheeses: The cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses*. Food Control, 2018, 92: 370-379.

Chen, Y., Ross, W. H., Whiting, R. C., Van Stelten, A., Nightingale, K. K., Wiedmann, M., Scott, V. N., *Variation in Listeria monocytogenes dose responses in relation to subtypes encoding a full-length or truncated internalin A*. Appl. Environ. Microbiol., 2011, 77.4: 1171-1180.

Choi, K. H., Lee, H., Lee, S., Kim, S., Yoon, Y., *Cheese microbial risk assessments—a review*. Asian-Australasian journal of animal sciences, 2016, 29.3: 307.

Commissione europea. REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.

Dalton, C. B., Merritt, T. D., Unicomb, L. E., Kirk, M. D., Stafford, R. J., Lalor, K., OzFoodNet Working Group, *A national case-control study of risk factors for listeriosis in Australia*. Epidemiology & Infection, 2011, 139.3: 437-445.

Delhalle, L., Ellouze, M., Yde, M., Clinquart, A., Daube, G., Korsak, N., *Retrospective analysis of a Listeria monocytogenes contamination episode in raw milk goat cheese using quantitative microbial risk assessment tools*. Journal of food protection, 2012, 75.12: 2122-2135.

Dumitrascu, L., Nicolau, A. I., Neagu, C., Didier, P., Maitre, I., Nguyen-The, C., Skuland, S. E., Moretro, T., Langsrud, S., Truninger, M., Teixeira, P., Ferreira, V., Martens, L., Borda, D., *Time-temperature profiles and Listeria monocytogenes presence in refrigerators from households with vulnerable consumers*. Food Control, 2020, 111: 107078.

European Food Safety Authority, *Analysis of the baseline survey on the prevalence of Listeria monocytogenes in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010–2011 Part A: Listeria monocytogenes prevalence estimates*. EFSA Journal, 2013, 11.6: 3241.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). *The European Union One Health 2018 Zoonoses Report*. EFSA Journal, 2019, 17.12: e05926.

European Food Safety Authority, Panel on biological hazards (BIOHAZ), et al., *Listeria monocytogenes contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU*. EFSA Journal, 2018, 16.1: e05134.

Evans, E. W., Redmond, E. C., *Analysis of older adults' domestic kitchen storage practices in the United Kingdom: identification of risk factors associated with listeriosis*. Journal of Food Protection, 2015, 78.4: 738-745.

Evans, E. W., Redmond, E. C., *Older adult consumer knowledge, attitudes, and self-reported storage practices of ready-to-eat food products and risks associated with listeriosis*. Journal of food protection, 2016, 79.2: 263-272.

Farber, J. M., Ross, W. H., Harwig, J., *Health risk assessment of Listeria monocytogenes in Canada*. International journal of food microbiology, 1996, 30.1-2: 145-156.

Gérard, A., El-Hajjaji, S., Niyonzima, E., Daube, G., Sindic, M., *Prevalence and survival of Listeria monocytogenes in various types of cheese—A review*. International Journal of Dairy Technology, 2018, 71.4: 825-843.

Heiman, K. E., Geralde, V. B., Gronostaj, M., Jackson, K. A., Beam, S., Joseph, L., Saupe, A., Ricotta, E., Waechter, H., Wellman, A., Adams-Cameron, M., Ray, G., Fields, A., Chen, Y., Datta, A., Burall, L., Sabol, A., Kucerova, Z., Trees, E., Metz, M., Leblanc, P., Lance, S., Griffin, P. M., Tauxe, R. V., Silk, B. J., *Multistate outbreak of listeriosis caused by imported cheese and evidence of cross-contamination of other cheeses, USA, 2012*. Epidemiology & Infection, 2016, 144.13: 2698-2708.

Jackson, K. A., Iwamoto, M., Swerdlow, D., *Pregnancy-associated listeriosis*. Epidemiology & Infection, 2010, 138.10: 1503-1509.

Kahraman, T., Cetin, O., Dumen, E., Buyukunal, S. K., *Incidence of Salmonella spp. and Listeria monocytogenes on equipment surfaces and personnel hands in meat plants*. Revue Med Vet, 2010, 161.3: 108-13.

Kapetanakou, A. E., Gkerekou, M. A., Vitzilaiou E. S., Skandamis P.N., *Assessing the capacity of growth, survival, and acid adaptive response of Listeria monocytogenes during storage of various cheeses and subsequent simulated gastric digestion*. International journal of food microbiology, 2017, 246: 50-63.

Koch, J., Dworak, R., Prager, R., Becker, B., Brockmann, S., Wicke, A., Wichmann-Schauer, H., Hof, H., Werber, D., Stark, K., *Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006–2007*. Foodborne Pathogens and Disease, 2010, 7.12: 1581-1584.

Lamboni, M., Sanaa, M., Tenenhaus-Aziza, F., *Sensitivity analysis for critical control points determination and uncertainty analysis to link fso and process criteria: application to listeria monocytogenes in soft cheese made from pasteurized milk*. Risk analysis, 2014, 34.4: 751-764.

Lee, S. H. I., Barancelli, G. V., de Camargo, T. M., Corassin, C. H., Rosim, R. E., da Cruz, A. G., Cappato, L. P., de Oliveira, C. A. F., *Biofilm-producing ability of Listeria monocytogenes isolates from Brazilian cheese processing plants*. Food Research International, 2017, 91: 88-91.

Longhi, C., Maffeo, A., Penta, M., Petrone, G., Seganti, L., Conte, M. P., *Detection of Listeria monocytogenes in Italian-style soft cheeses*. Journal of applied microbiology, 2003, 94.5: 879-885.

Lundén, J., Vanhanen, V., Myllymaki, T., Laamanen, E., Kotilainen, K., Hemminki, K., *Temperature control efficacy of retail refrigeration equipment*. Food Control, 2014, 45: 109-114.

Martinez-Rios, V., Jorgensen, M. O., Koukou, I., Gkogka, E., *Growth and growth boundary model with terms for melting salts to predict growth responses of Listeria monocytogenes in spreadable processed cheese*. Food microbiology, 2019, 84: 103255.

Mcintyre, L., Wilcott, L., Naus, M., *Listeriosis outbreaks in British Columbia, Canada, caused by soft ripened cheese contaminated from environmental sources*. BioMed research international, 2015, 2015.

Melo, J., Andrew, P. W., Faleiro, M. L., *Listeria monocytogenes in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses*. Food Research International, 2015, 67: 75-90.

Pérez-Rodríguez, F., Carrasco, E., Bover-Cid, S., Jofré, A., Valero, A., *Closing gaps for performing a risk assessment on Listeria monocytogenes in ready-to-eat (RTE) foods: activity 2, a quantitative risk characterization on L. monocytogenes in RTE foods; starting from the retail stage*. EFSA Supporting Publications, 2017, 14.7: 1252E.

Pizarro-Cerda, J., Cossart, P., *Listeria monocytogenes: cell biology of invasion and intracellular growth*. Gram-Positive Pathogens, 2019, 851-863.

Pouillot, R., Hoelzer, K., Chen, Y., Dennis, S. B., *Listeria monocytogenes Dose Response Revisited—Incorporating Adjustments for Variability in Strain Virulence and Host Susceptibility*. Risk Analysis, 2015, 35.1: 90-108.

Preubel, K., Milde-Busch, A., Schmich, P., Wetzstein, M., Stark, K., Werber, D., *Risk factors for sporadic non-pregnancy associated listeriosis in Germany—immunocompromised patients and frequently consumed ready-to-eat products*. PLoS One, 2015, 10.11: e0142986.

Pricope-Ciolacu, L., Nicolau, A. I., Wagner, M., Rychli, K., *The effect of milk components and storage conditions on the virulence of Listeria monocytogenes as determined by a Caco-2 cell assay*. International journal of food microbiology, 2013, 166.1: 59-64.

Schoder, D., Malzner, D., Schmalwieser, A., Zangana, A., Winter, P., Wagner, M., *Important vectors for Listeria monocytogenes transmission at farm dairies manufacturing fresh sheep and goat cheese from raw milk*. Journal of Food Protection, 2011, 74.6: 919-924.

Soravito, L., *Prove di inoculazione sperimentale di Lysteria Monocytogenes in prodotti della gastronomia*. 2010.

Thakur, M., Asrani, R. K., Patial, V., *Listeria monocytogenes: A food-borne pathogen*. In: Foodborne Diseases. Academic Press, 2018. p. 157-192.

Tiwari, U., Cummins, E., Valero, A., Walsh, D., Dalmaso, M., Jordan, K., Duffy, G., *Farm to fork quantitative risk assessment of Listeria monocytogenes contamination in raw and pasteurized milk cheese in Ireland*. Risk Analysis, 2015, 35.6: 1140-1153.

UNI EN ISO 11290-1:2017, Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp.-Part1: Detection method.

UNI EN ISO 11290-2:2017, Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp.-Part 2: Enumeration method.

Wemmenhove, E., *Risk assessment of Listeria monocytogenes in Gouda cheese*. 2019. PhD Thesis. Wageningen University.

Whitley, E., Muir, D., Waites, W. M., *The growth of Listeria monocytogenes in cheese packed under a modified atmosphere*. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88.1: 52-57.

World Health Organization, *Risk assessment of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods: technical report*. Food & Agriculture Org., 2004.

<http://www.ismea.it/istituto-di-servizi-per-il-mercato-agricolo-alimentare>