



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Listeria monocytogenes: batterio insidioso agente di Listeriosi

18 ottobre 2019

Fossanova – ex Infermeria

Dott.ssa Tiziana Zottola

Medico Veterinario

IZSLT Unità Operativa Territoriale LAZIO SUD
sede di Latina

tiziana.zottola@izslt.it

Tel. 0773 696663



ASL FROSINONE

UOC Servizio Igiene degli Alimenti di Origine Animale

ASL LATINA

UOC Servizio Igiene degli Alimenti di Origine Animale

Settimana della
SICUREZZA ALIMENTARE
III° Edizione



PROSPETTIVE APPLICATIVE DELLA
NORMATIVA UNIONALE SUI CONTROLLI
UFFICIALI IN SICUREZZA ALIMENTARE
E SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA:
RISCHI EMERGENTI, CONTROLLI
UFFICIALI E MTA (MALATTIE
TRASMESSE DA ALIMENTI)

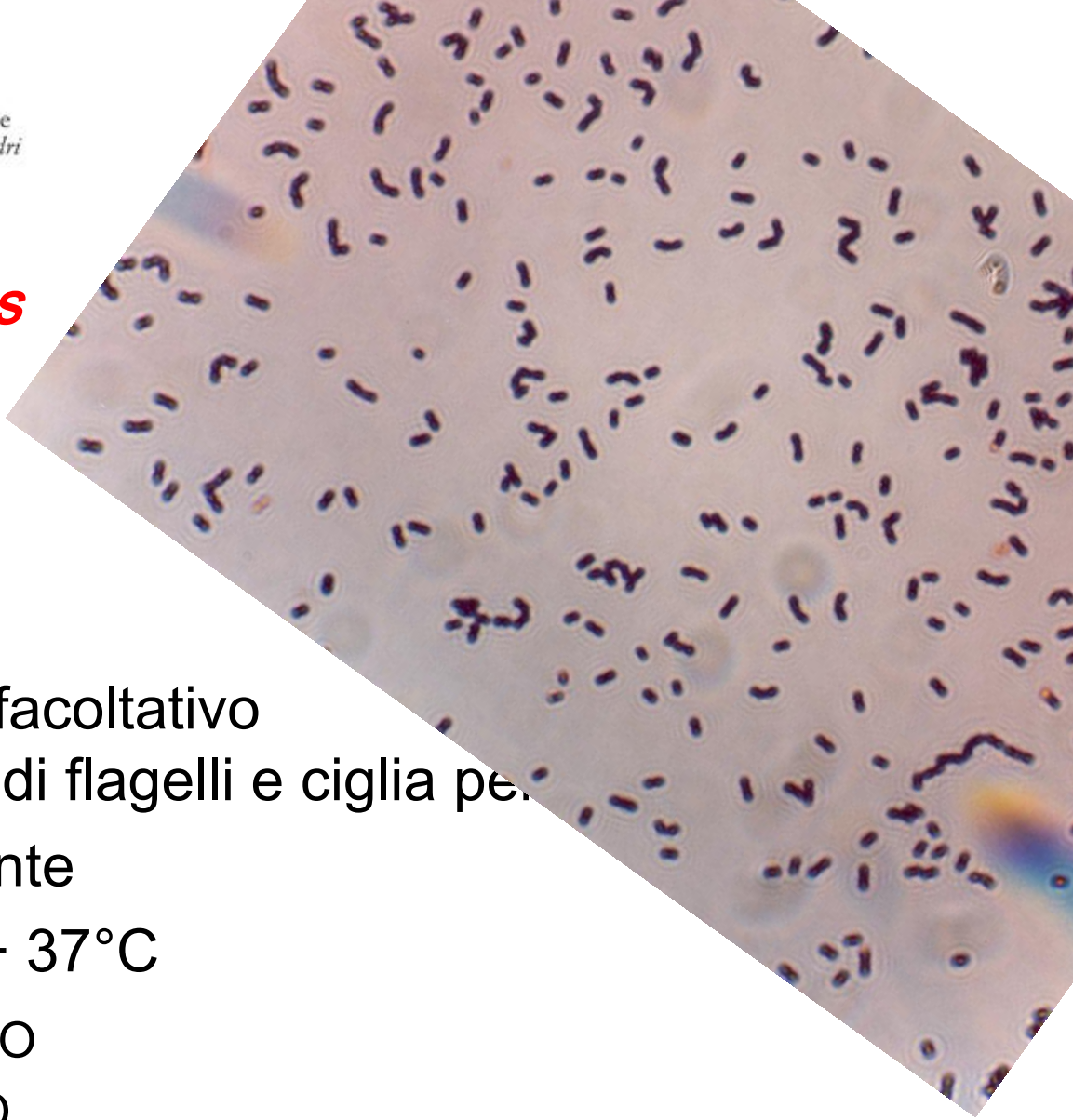


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Listeria monocytogenes

è un batterio Gram +
di forma bastoncellare
0,5 – 2 μm x 0,5 μm

- asporigeno
- aerobio e anaerobio facoltativo
- mobile per presenza di flagelli e ciglia per
 - ✓ Mobile a T ambiente
 - ✓ Immobile a T. di + 37°C
 - ✓ Ossidasi NEGATIVO
- Catalasi POSITIVO
- 13 serovar - 5 sierogruppi





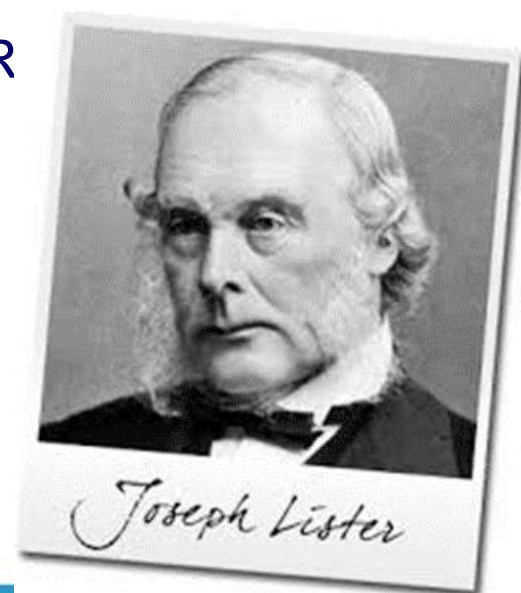
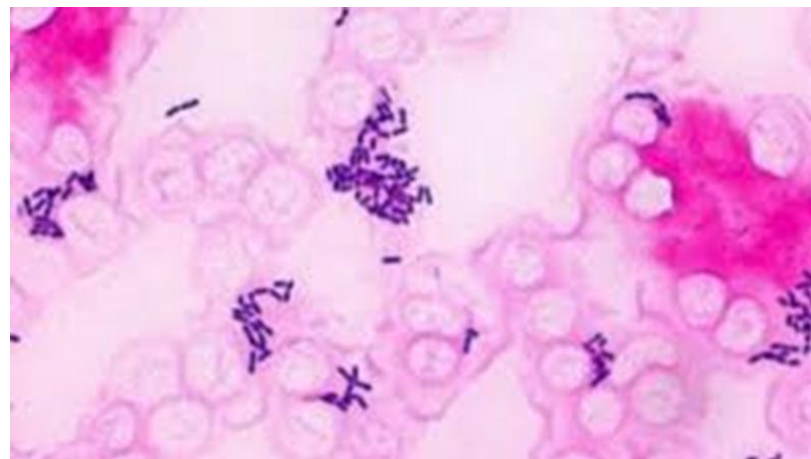
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

MURRAY la isolò per la prima volta nel 1926 dal fegato e dal sangue di conigli e di cavie che presentavano monocitosi.

La chiamò *Bacterium monocytogenes*.

In seguito il batterio fu dedicato a JOSEPH LISTER chirurgo britannico padre dell'antisepsi per cui assunse il nome di *Listeria monocytogenes*.

Negli anni '70 fu riconosciuto agente malattia nell'uomo e negli anni '80 patogeno di origine alimentare.



10 specie di Listeria monocytogenes, ivanovii (le 2 sole PATOGENE?), innocua, welshimeri, seeligeri, grayi, marthii, rocourtiae, fleishmannii, weihenstephanensis.

Specie	Serovar
<i>L. monocytogenes</i>	1/2 a,b,c 3a,b,c, 4a,ab,c,d,e,7
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a,6b
<i>L. seeligeri</i>	1/2a,b,c 3a,b,c, 4a,ab,c,d,e
<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b
<i>L. ivanovii</i>	5

Listeria monocytogenes:
13 serovar

Più frequenti i sierotipi
1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b

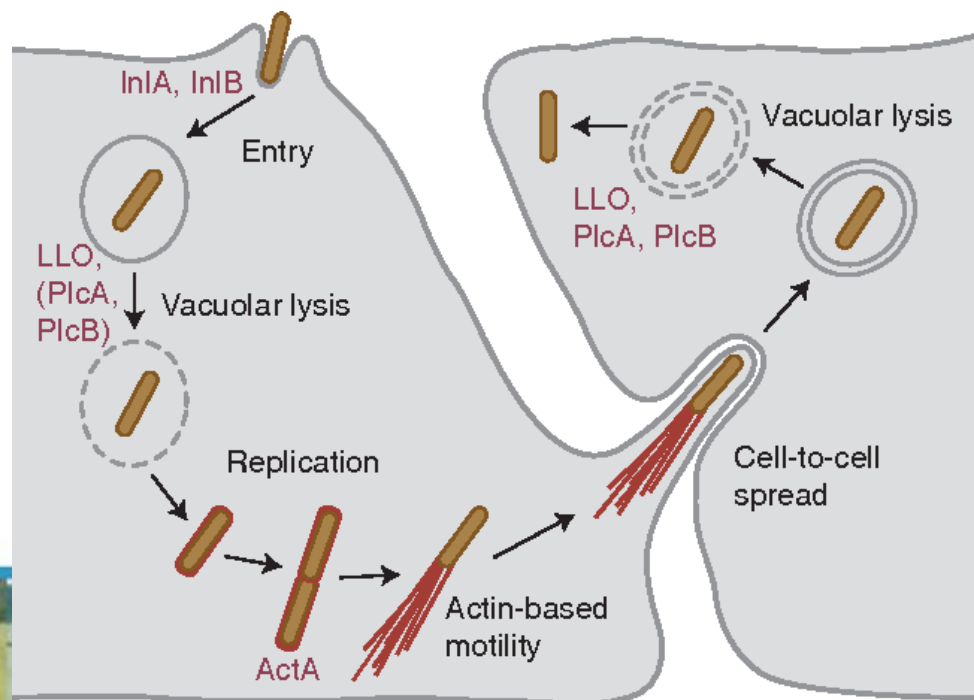
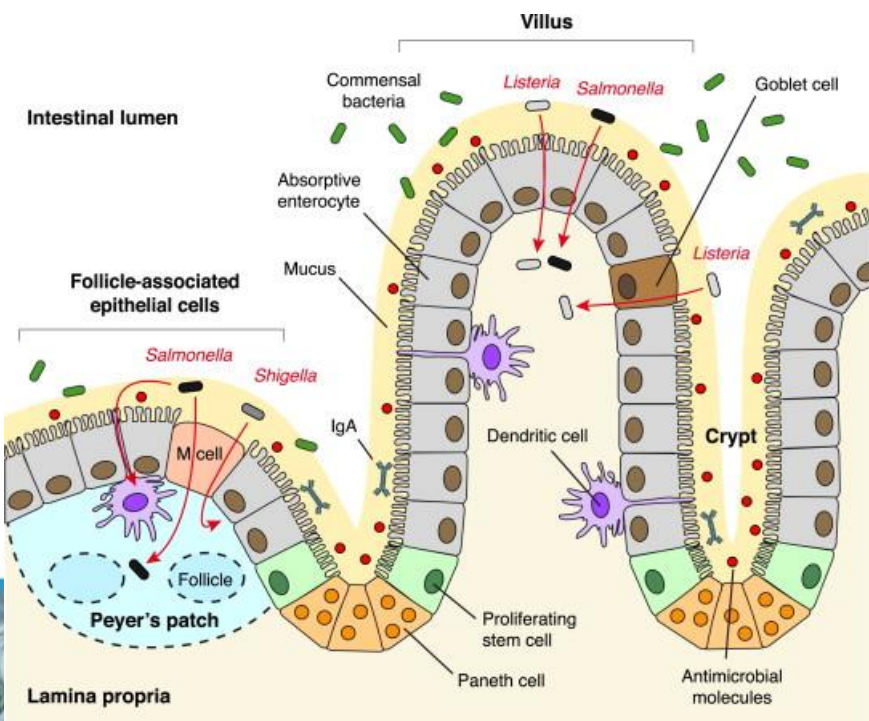
Listeria spp. 17 serovar

ISOLATI DA
alimenti,
ambienti di produzione,
su superfici a contatto
con gli alimenti

PATOGENESI

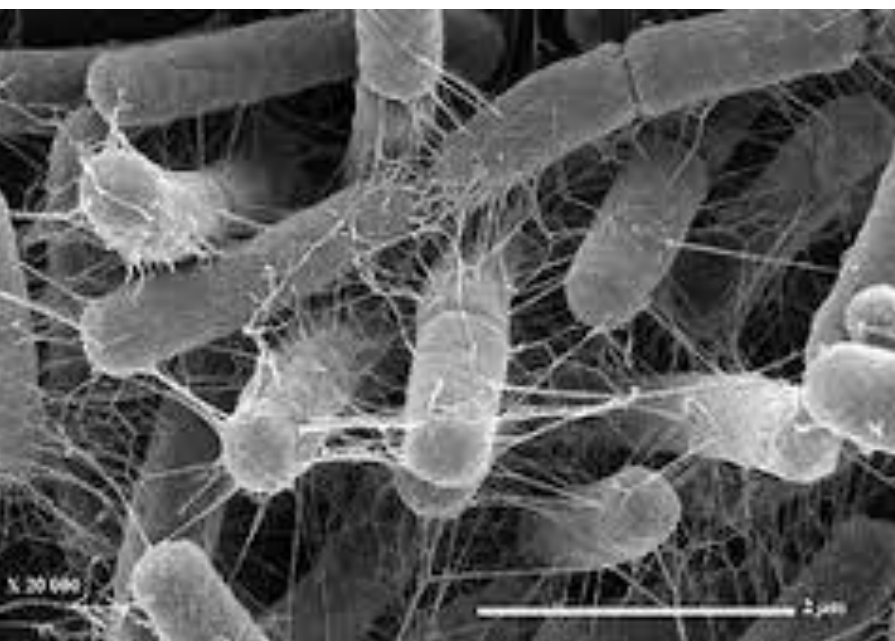
L. monocytogenes penetra nei siti di estrusione cellulare alla punta dei villi o alle giunzioni tra calice e cellule epiteliali assorbenti, può insinuarsi nelle cellule scollandone le gap junction e arrivare ai capillari sanguigni e linfatici. Invade il citoplasma dei monociti (da cui *monocytogenes*), dei macrofagi e dei Leucociti polimorfonucleati ed è quindi trasportato dal **sangue** e arriva alle cellule del Kuppfer del fegato e ai macrofagi della milza.

Virulenza : *internaline A e B*, due fosfolipasi, *listeriolisina O*, proteina *ActA*.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*





Listeria monocytogenes

	Minimo	Ottimale	Massimo
Temperatura	- 1.5 C	30 – 37 °C	45 °C
pH	4.2 – 4.3	7.0	9.4 – 9.5
Aw	0.93	0.99	> 0.99
Concentrazione salina	< 0.5 %	0.7 %	12 – 16 %
Atmosfera	Aerobio ed anaerobio facoltativo. Cresce sottovuoto ed in atmosfera protettiva		
Inattivazione	10 sec a 72,3 °C	1 sec a 85 °C	9,5-18,8 min a 62°C
Resistenza	Fino a 18 mesi terreno , latte, insilati, escrementi		

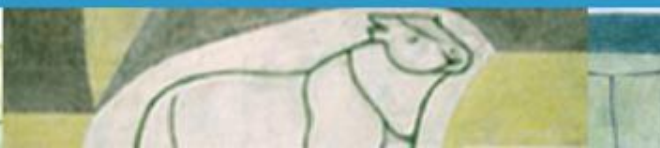


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



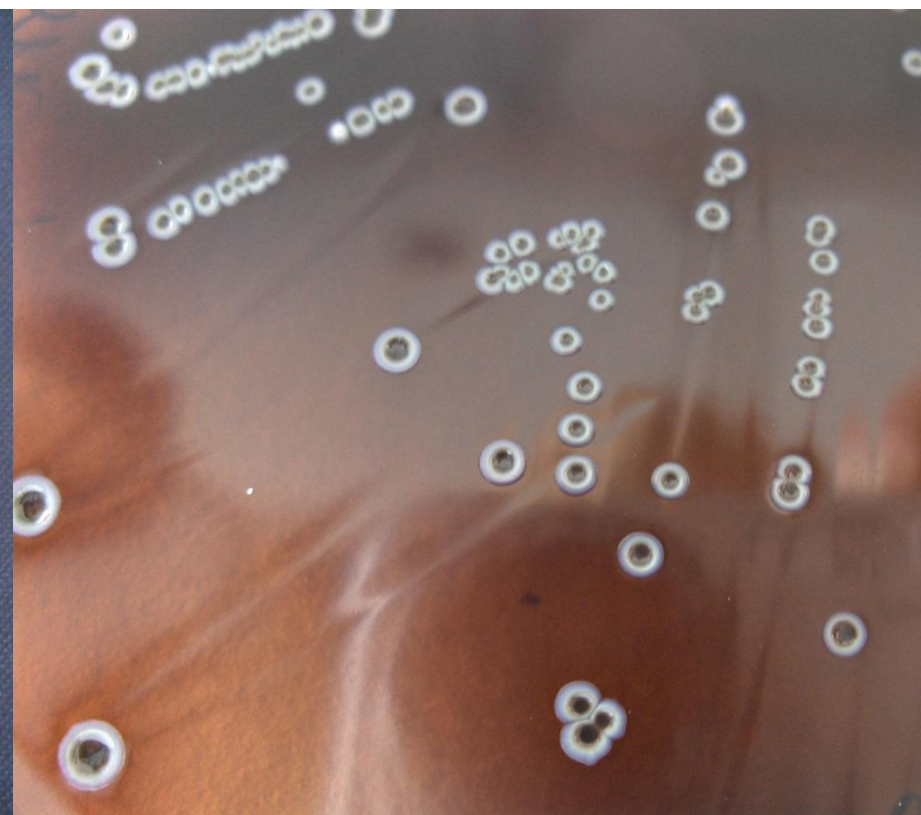


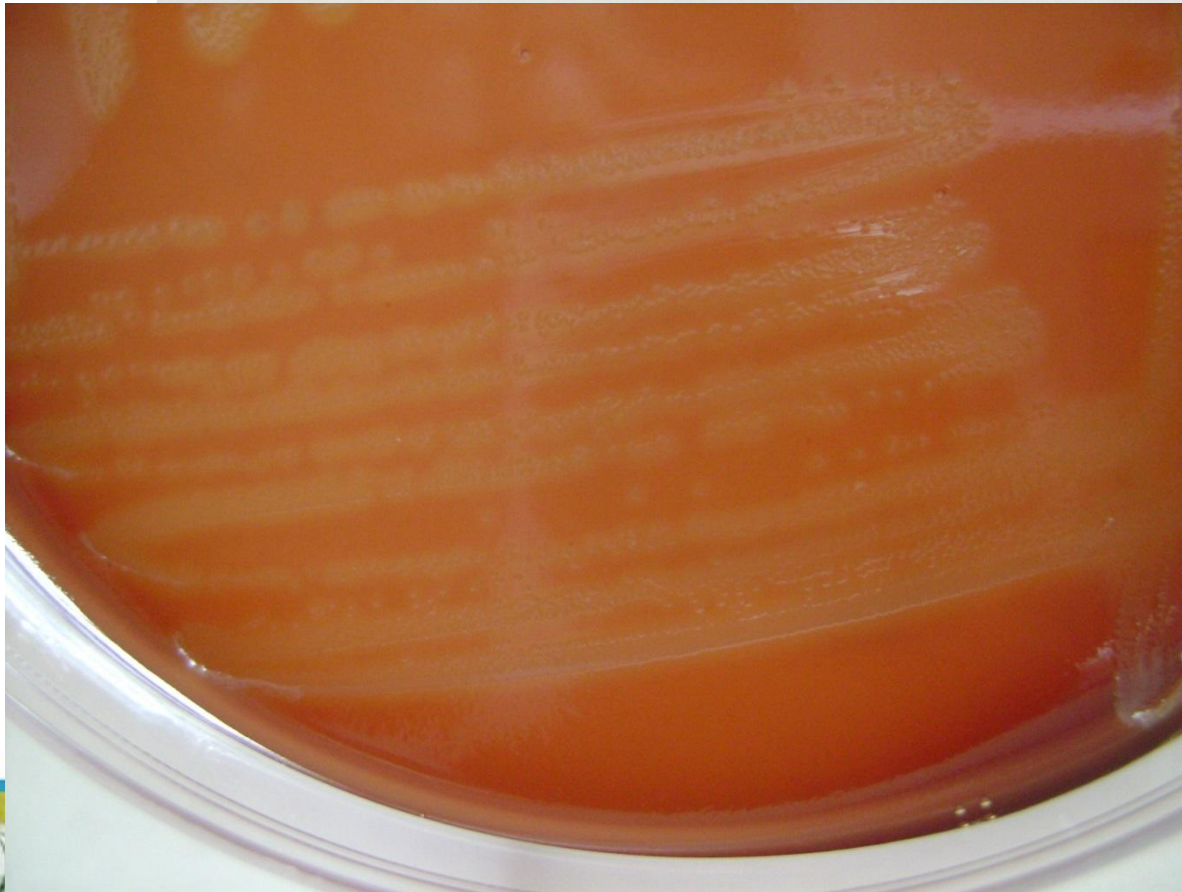
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

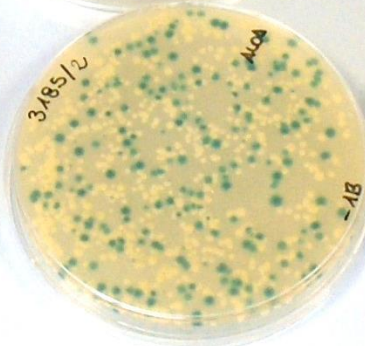
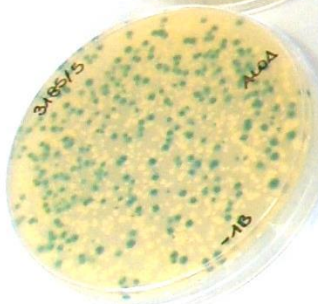
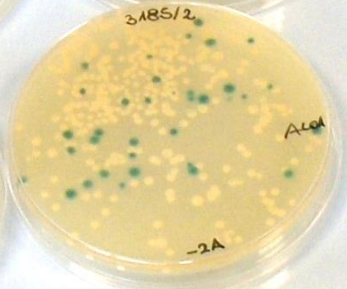
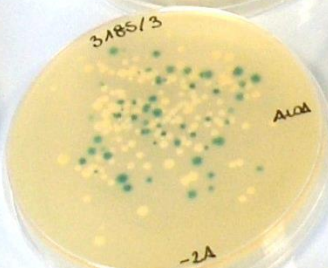
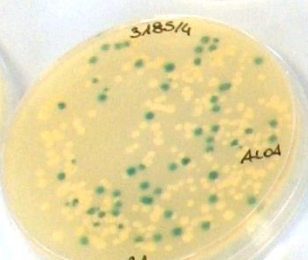
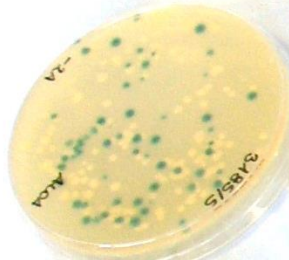
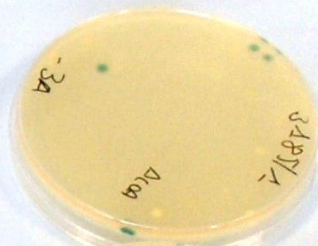
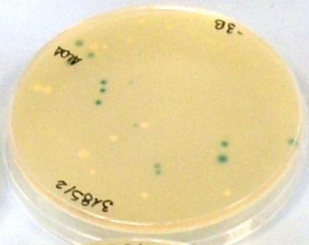
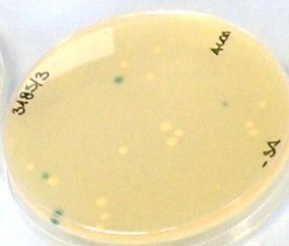
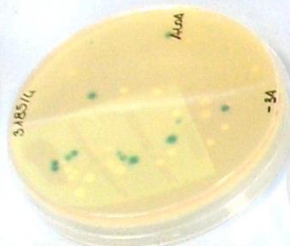
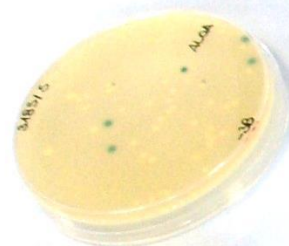




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*







REG. 882/2004

Gli alimenti devono essere sicuri e sani

SICUREZZA

Un alimento è SICURO se esiste una ragionevole certezza che il suo consumo nelle normali condizioni d'uso, non provocherà danno (ECDC 1993 – European Center for Disease Prevention and Control)

Un alimento è SICURO quando è conforme agli aspetti di sicurezza alimentare disciplinati dalle normative



SALUBRITA'

**Un alimento è SALUBRE
quando è idoneo
al consumo umano**

Un alimento è SICURO quando è innocuo



SICUREZZA

INNOCUITA'

**Un alimento è INNOCUO
quando non presenta
rischi per la salute**



Monitoraggio annuale di *Listeria* nella filiera alimentare

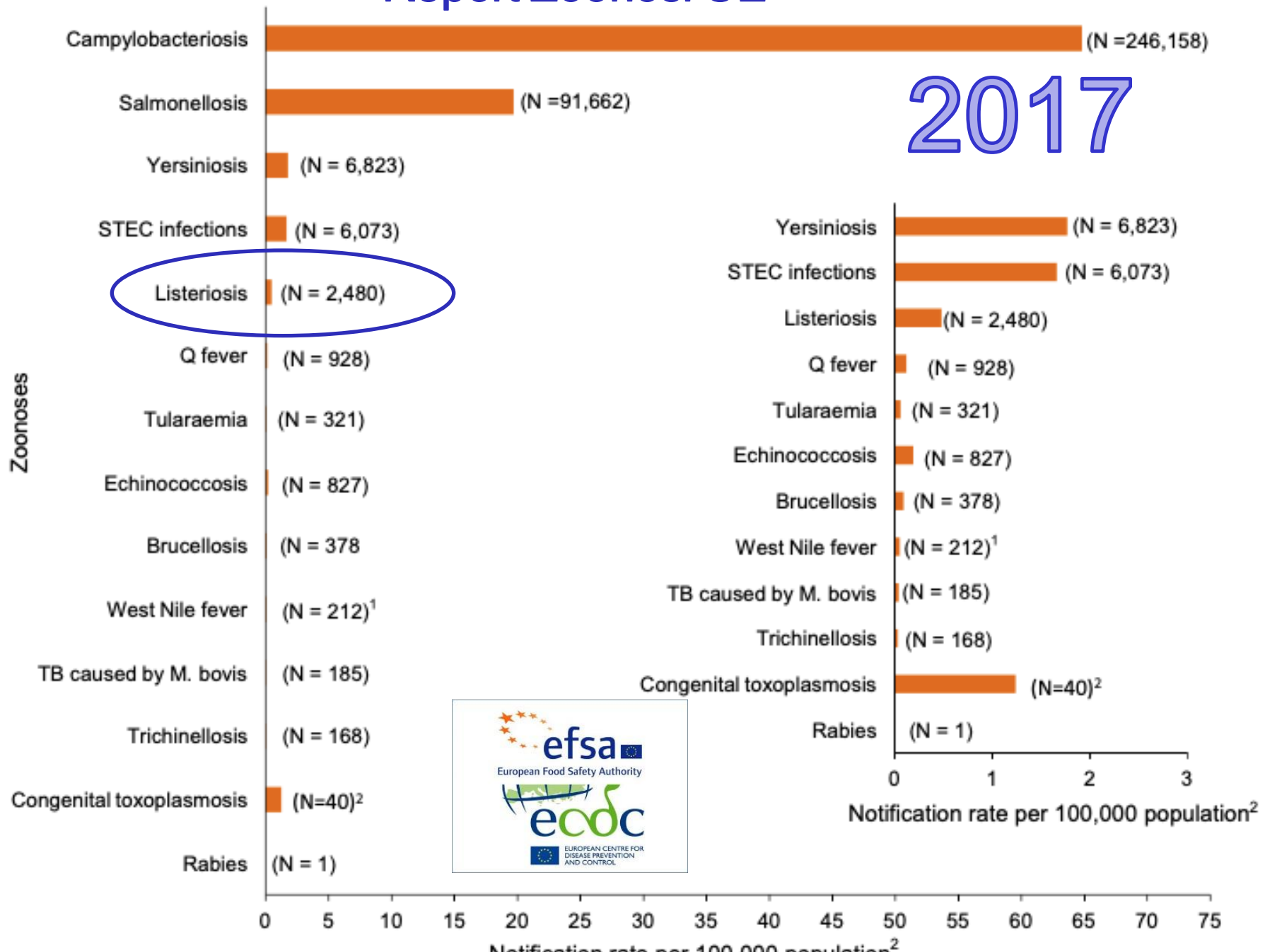
L'EFSA - Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare - raccoglie e analizza i dati a livello UE (28 Stati membri + altri stati europei che aderiscono spontaneamente alla raccolta dati) sulla presenza di *Listeria monocytogenes* nella filiera alimentare.

L'ECDC - Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie – che a sede a Stoccolma in Svezia, raccoglie ed analizza i dati relativi zoonosi nell'uomo.

I risultati sono pubblicati nei Report EFSA-ECDC, sintetiche relazioni annuali.

Report Zoonosi UE

2017



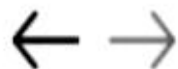
La più grave epidemia di listeriosi

Tra il gennaio 2017 e il
2 marzo 2018,
in SUDAFRICA le analisi di
laboratorio hanno
confermato **948** casi di
persone contaminate, con
659 ricoveri in ospedale e
180 decessi.
Tasso di mortalità del 27%





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



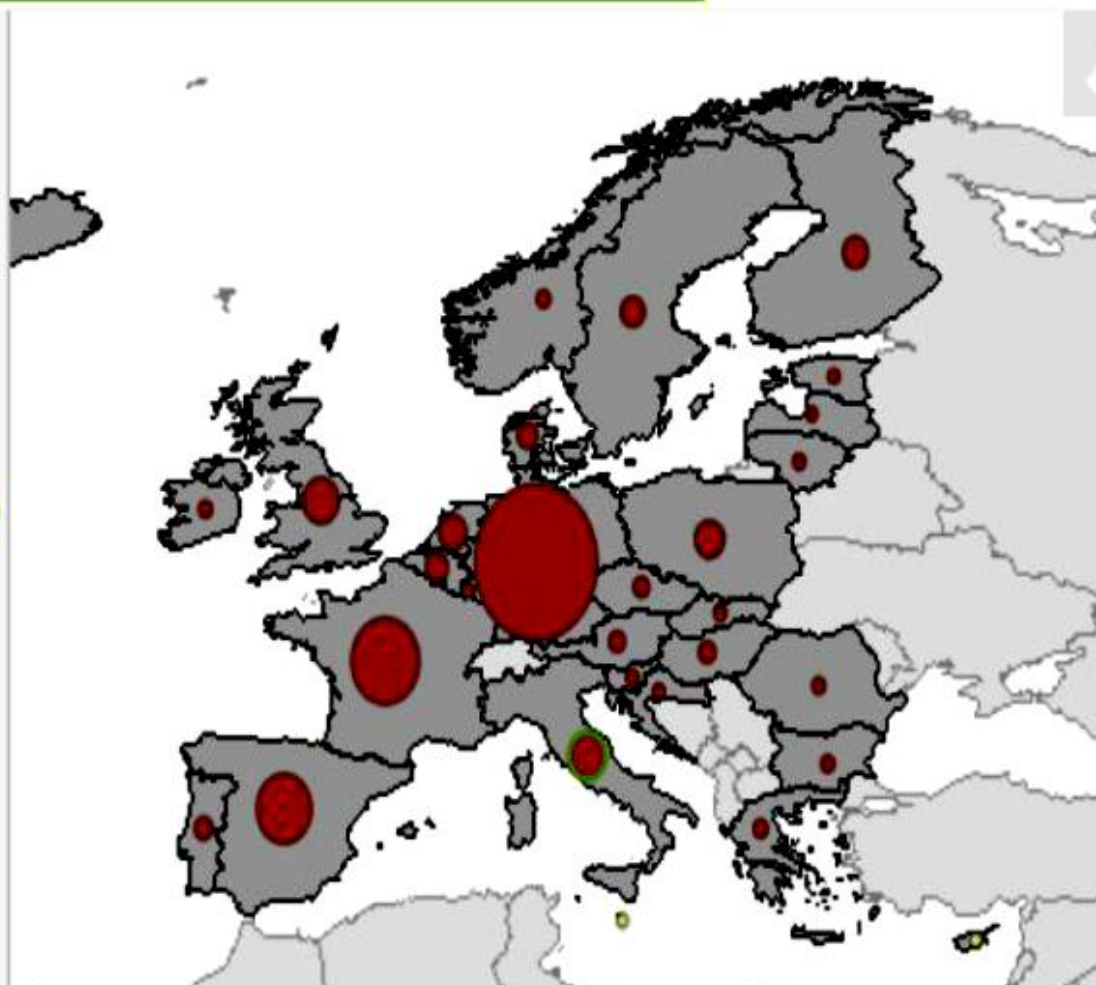
Listeriosis ▼

Confirmed cases ▼

Reported cases ▼

▶ ◀◀ 2017 ▶▶

Region	Reported cases (N)
EU/EEA	2502
EU	2480
Germany	726
France	370
Spain	284
Italy	164
United Kingdom	160
Poland	116
Netherlands	108
Finland	89





Trend Listeriosi in Europa



Casi di listeriosi 2017	→	2.480	
2016	→	2.509	246 decessi
2015	→	2.726	18,8% decessi

La fascia di popolazione più colpita è quella anziana, in particolare i soggetti di oltre 84 anni. In questa fascia di età il tasso di mortalità per Listeriosi è stato del **24% (2017)**; globalmente nell'UE è deceduto 1 paziente ogni 10. **I più alti livelli di L.monocytogenes** sono stati rilevati in **pesce e prodotti della pesca (6%)**
trota e salmone affumicati a freddo e insalate pronte (4,2%).

Sensibilità alla malattia

Gli individui più sensibili alle infezioni da *Listeria* sono

Anziani,

Donne in gravidanza,

Neonati,

Persone con deficit del sistema immunitario,

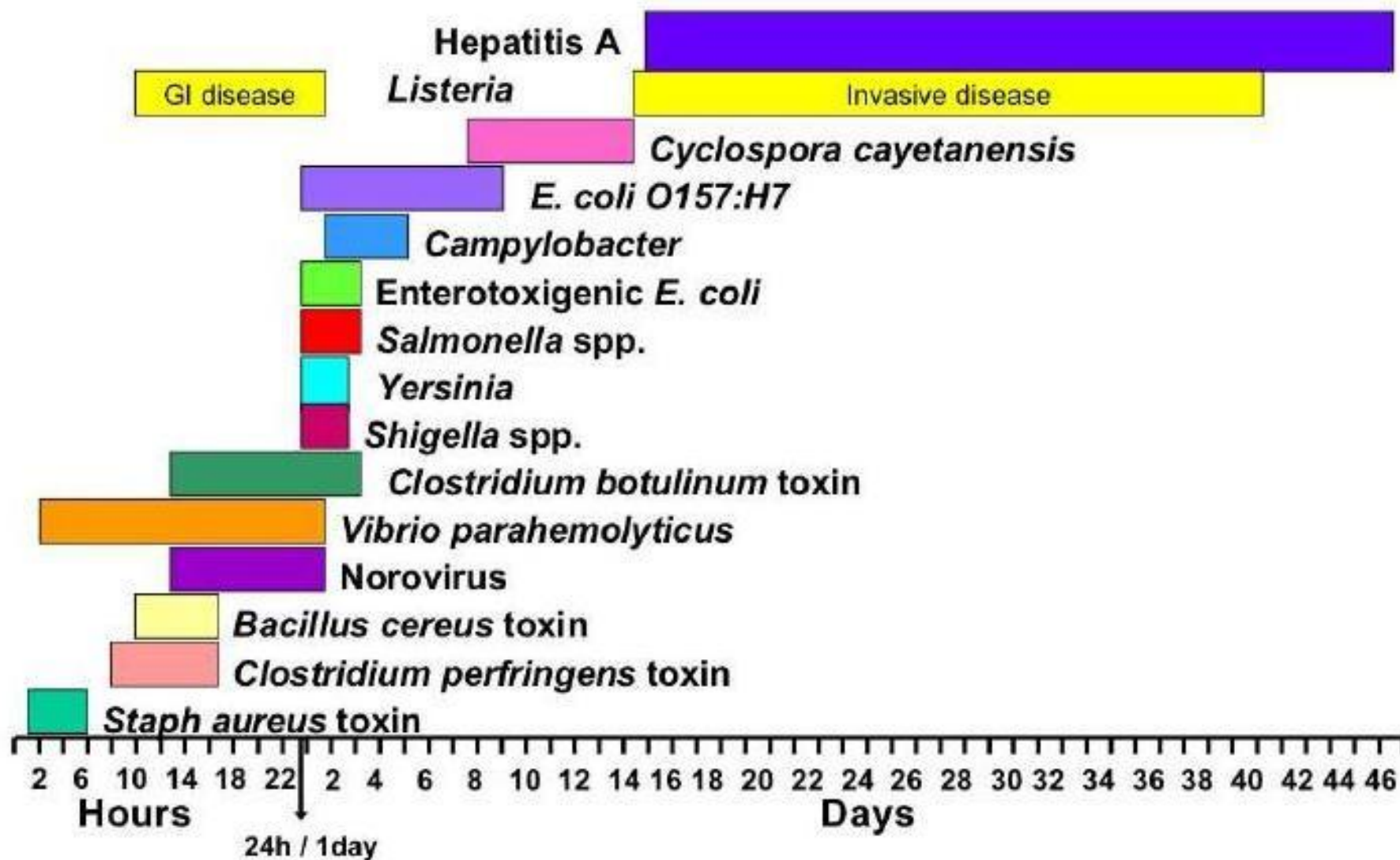
Persone che hanno subito un trapianto e stanno assumendo farmaci per evitare il rigetto

Persone affette da Hiv/AID o altre patologie immunitarie, tumori, patologia renale in stadio avanzato, patologie epatiche, alcolismo, diabete

Y	Young
O	Old
P	Pregnant
I	Immunocompromised



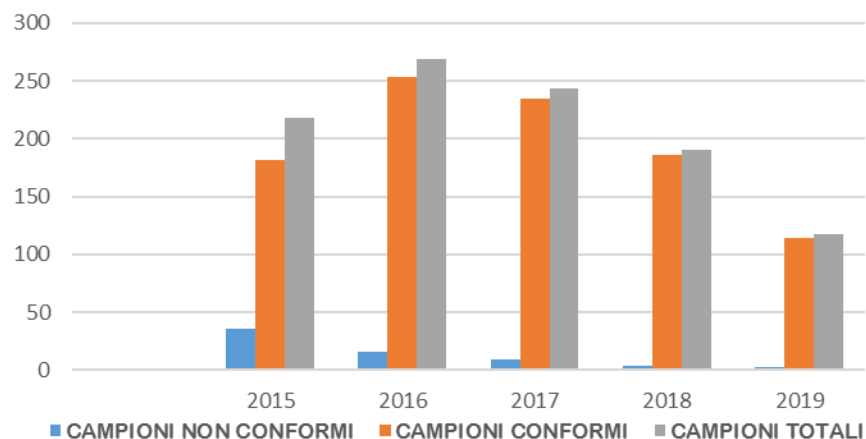
Periodo di incubazione degli agenti di tossinfezione alimentare



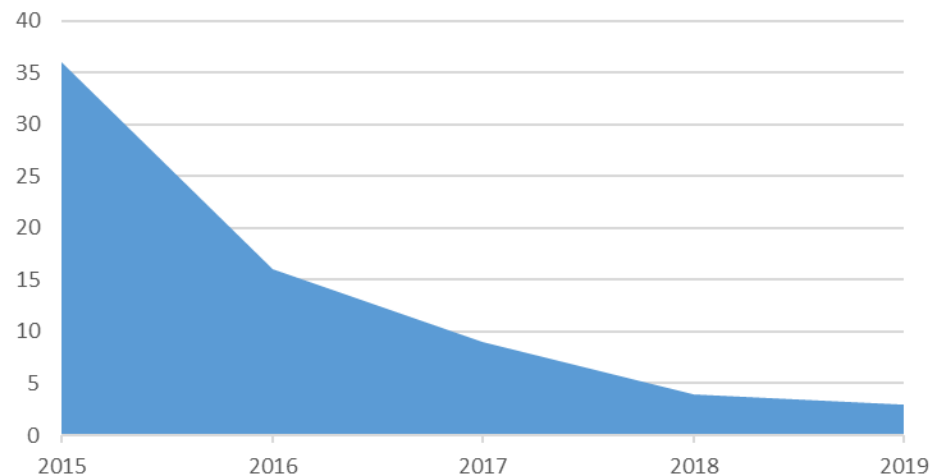


dati UOT LAZIO SUD

CAMPIONI PERVENUTI 2015-2019



CAMPIONI POSITIVI 2015-2019



ANNO	CAMPIONI NON CONFORMI	CAMPIONI CONFORMI	CAMPIONI TOTALI
2015	36	182	218
2016	16	253	269
2017	9	235	244
2018	4	186	190
2019	3	114	117

T5 RT-MAP



T5 RT-C



T8 RT-MAP



T8 RT-C



T15 RT-MAP



T15 RT-C



T22 RT-MAP





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Isolamenti UOT LAZIO SUD anni 2015 -2019

MATRICE	LISTERIA MONOCYTOGENES			
		LISTERIA INNOCUA	LISTERIA WELSHIMERI	LISTERIA SEELIGERI
SALAME	X			
SALSICCIA STAGIONATA	X	X		
SALSICCIA FRESCA	X	X		
PANCETTA	X	X		
COPPA	X	X		
GUANCIALE	X			
CARNE A PEZZI DI TACCHINO	X			
SOVRACCOSCIA BOVINO	X			
PESCE SPADA AFFUMICATO	X			
SALMONE AFFUMICATO	X	X	X	
CHIOCCIOLE	X	X		
TRAMEZZINO	X	X		
FISHBURGHER	X			
MOZZARELLA	X	X		X
GORGONZOLA	X			
TAMPONE AMBIENTALE		X		
INSALATA VERDE MISTA				X

Alimenti pronti che **NON costituiscono un terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*:**

- **Alimenti con un periodo di conservabilità inferiore a 5 gg;**
- **Alimenti con $\text{pH} \leq 4,4$;**
- **Alimenti con $A_w \leq 0,92$;**
- **Alimenti con $\text{pH} \leq 5,0$ e $A_w \leq 0,94$.**

Anche altri tipi di prodotti possono appartenere a questa categoria purché vi sia una giustificazione scientifica*. Nota 8 del Reg.2073/2005



Listeria monocytogenes è un criterio di sicurezza alimentare ai sensi del Reg. CE 2073/2005

In base all'analisi del rischio è stato stabilito che, per quelle combinazioni microorganismo/alimento, la fissazione di un criterio possa contribuire alla tutela della salute dei consumatori.

Le mutate condizioni epidemiologiche o le accresciute conoscenze scientifiche possono portare ad aggiornamenti nei criteri di sicurezza (E. coli VTEC - Reg UE n. 209/2013)



formano
biofilm

- ✓ **Salmonella spp.,**
- ✓ **Klebsiella spp.,**
- ✓ **Pseudomonas spp.,**
- ✓ **Campylobacter spp.,**
- ✓ **Escherichia coli,**
- ✓ **E.coli STEC,**
- ✓ **Listeria spp.,**
- ✓ **Staphylococcus aureus**



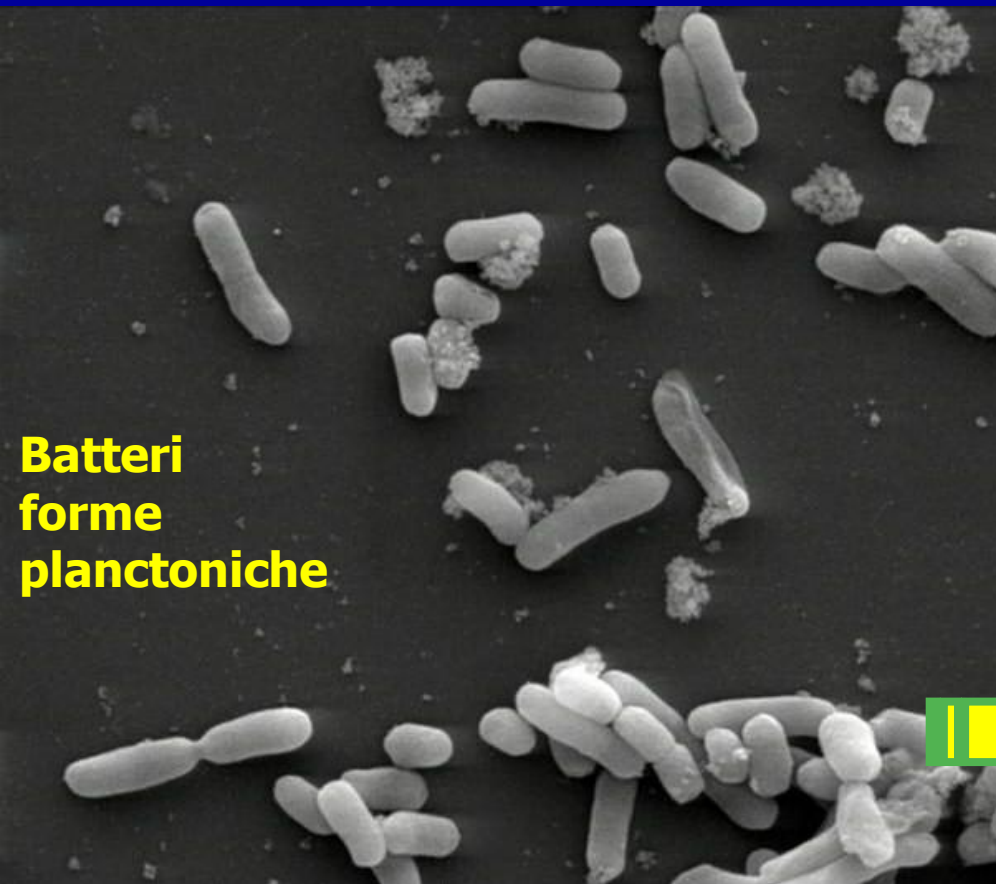
I microrganismi sono in grado di adattarsi in modo **dinamico e rapido** alle influenze **abiotiche** e **biotiche**



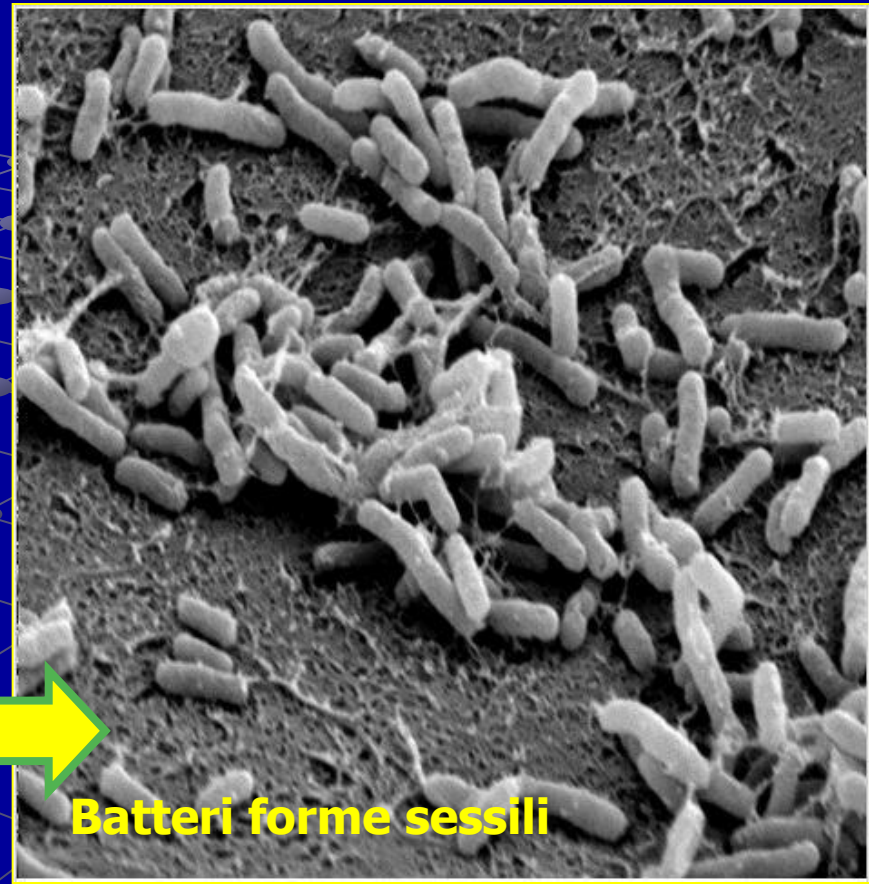
**FISICHE
CHIMICHE
TECNOLOGICHE**

**REAZIONI
e
INTERAZIONI
MICROBICHE**

Relazione / Inter-relazione



**Batteri
forme
planctoniche**



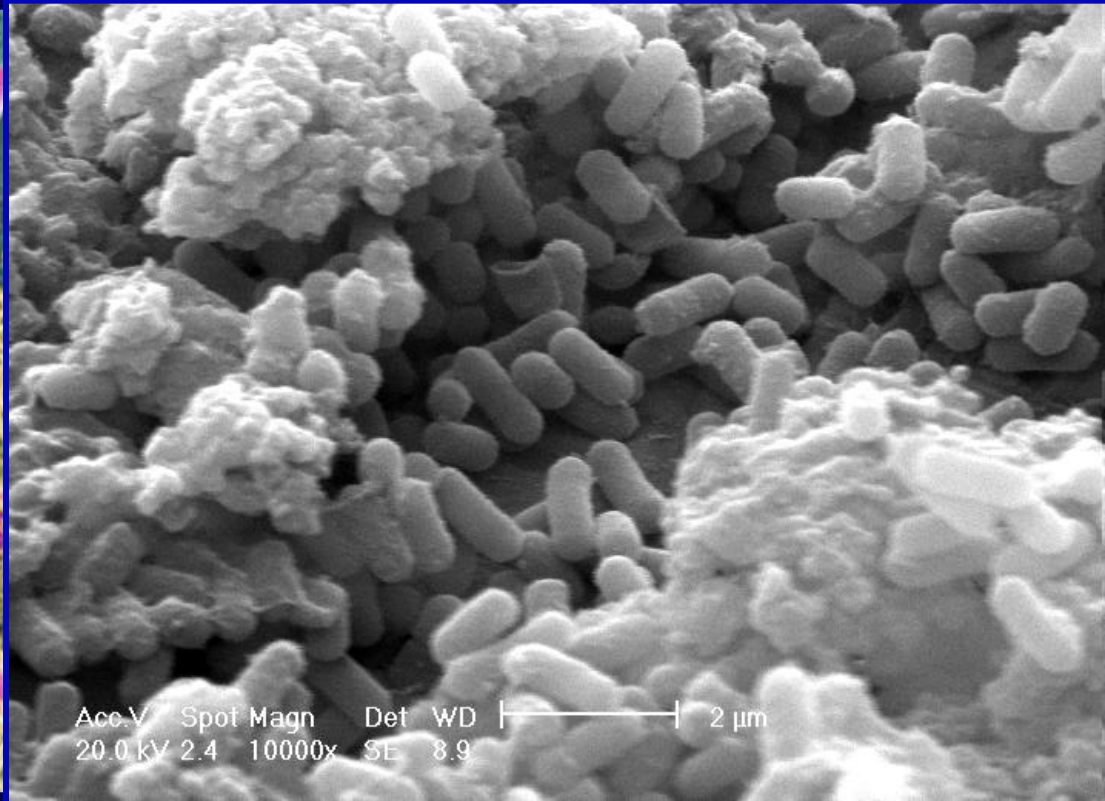
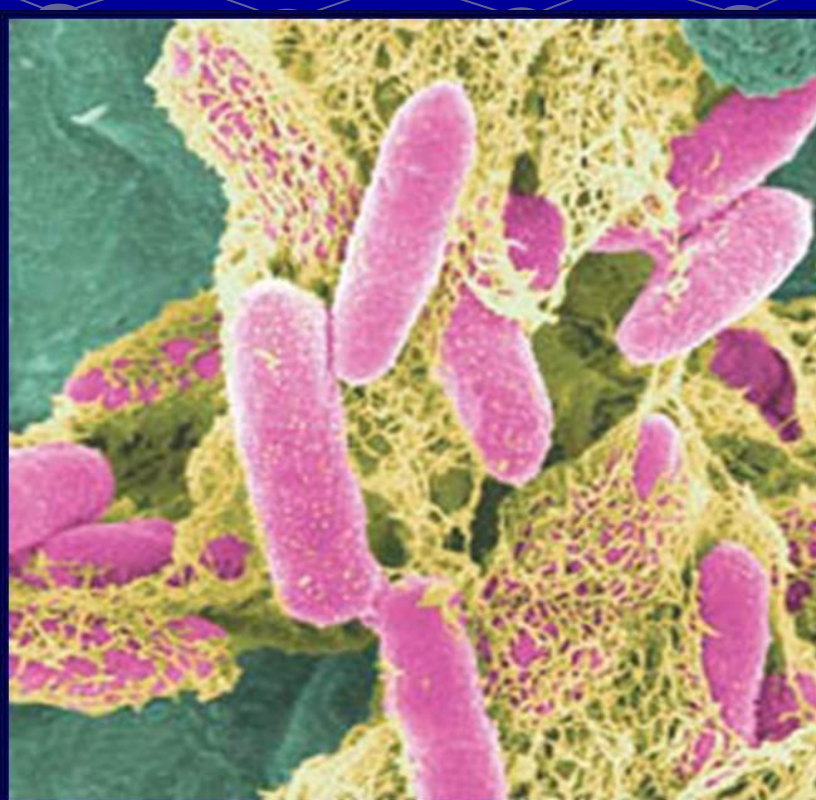
Batteri forme sessili



cambiamenti fisiologici indotti da
stimoli ambientali e controllati
geneticamente

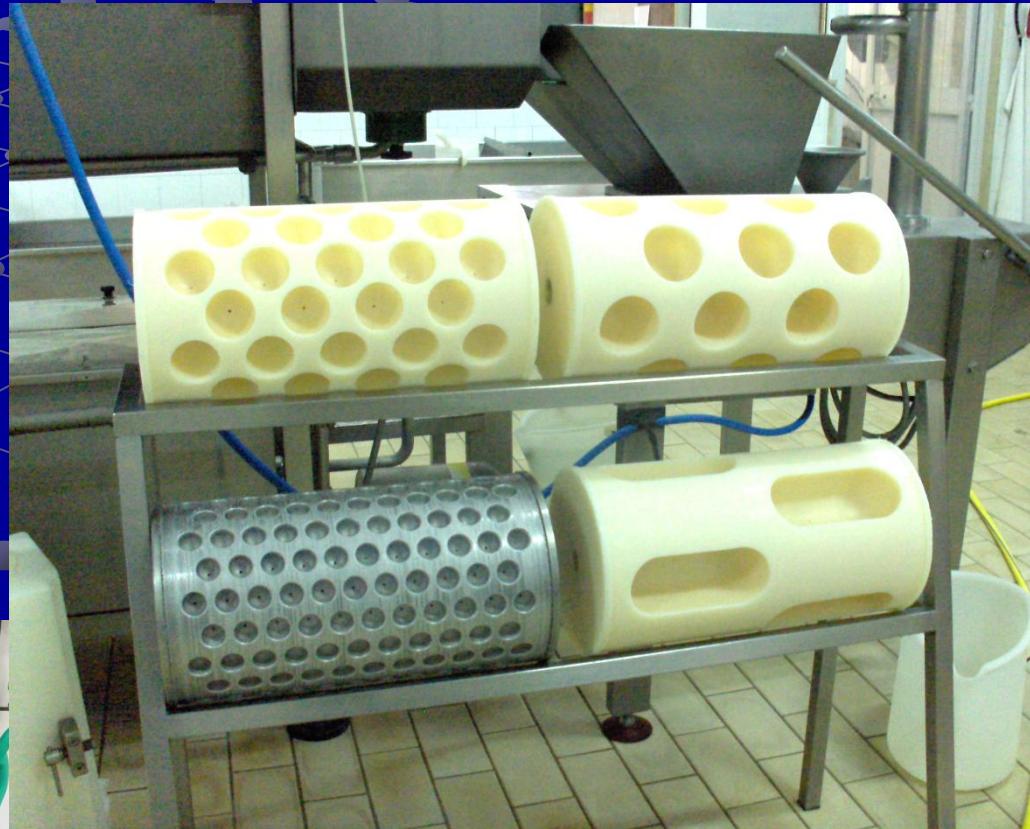
Biofilm

- Il biofilm è un insieme di cellule microbiche **irreversibilmente associate** con una superficie e incluse in una matrice polisaccaridica.



I biofilm microbici che si producono negli ecosistemi naturali e nei sistemi industriali sono strutture complesse ed eterogenee, costituite da *cellule microbiche e polimeri extracellulari (EPS)* dove possono coesistere microrganismi autoctoni, patogeni, opportunisti e composti organici ed inorganici

- La formazione di biofilm può realizzarsi su qualsiasi tipo di superficie anche organica



Principali variabili responsabili dell'adesione cellulare e della formazione del biofilm

Proprietà del substrato

Struttura e
Microtopografia

Idrorepellenza

Temperatura, pH

Presenza di agenti
antimicrobici

Proprietà delle cellule

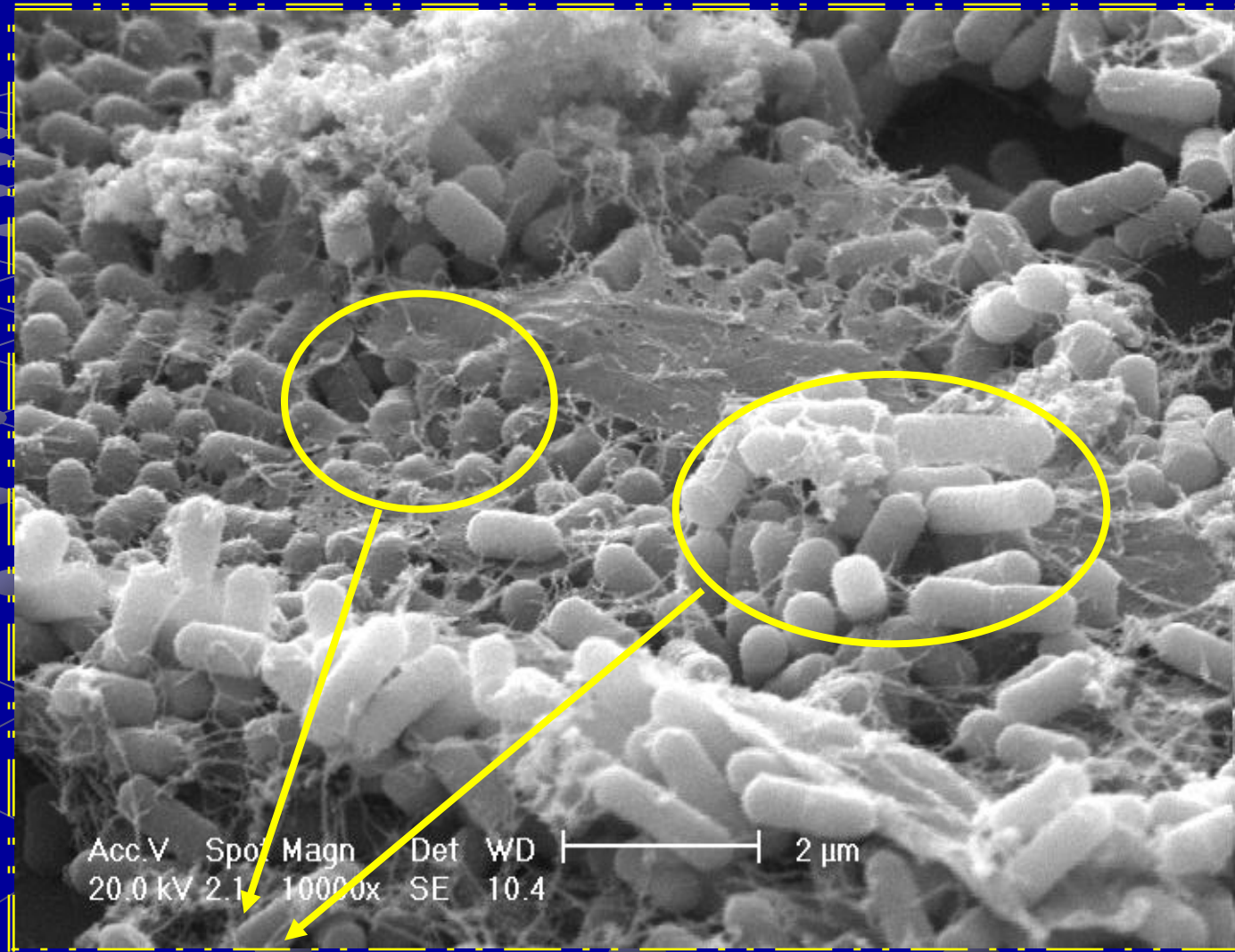
Idrofobicità della
superficie cellulare

Fimbrie, pili

Flagelli

Sostanze polimeriche
extracellulari

Biofilm “maturo”



Ianieri et al. 2008

La distribuzione cellulare non è uniforme

Classificazione dei materiali in relazione alla capacità di supportare lo sviluppo dei biofilm

Attitudine a supportare la formazione di biofilm

Elevata

Materiale

Lattice

Etilene-propilene

Polietilene

Acciaio dolce

Polivinilcloruro non plastificato

Polivinilcloruro clorinato

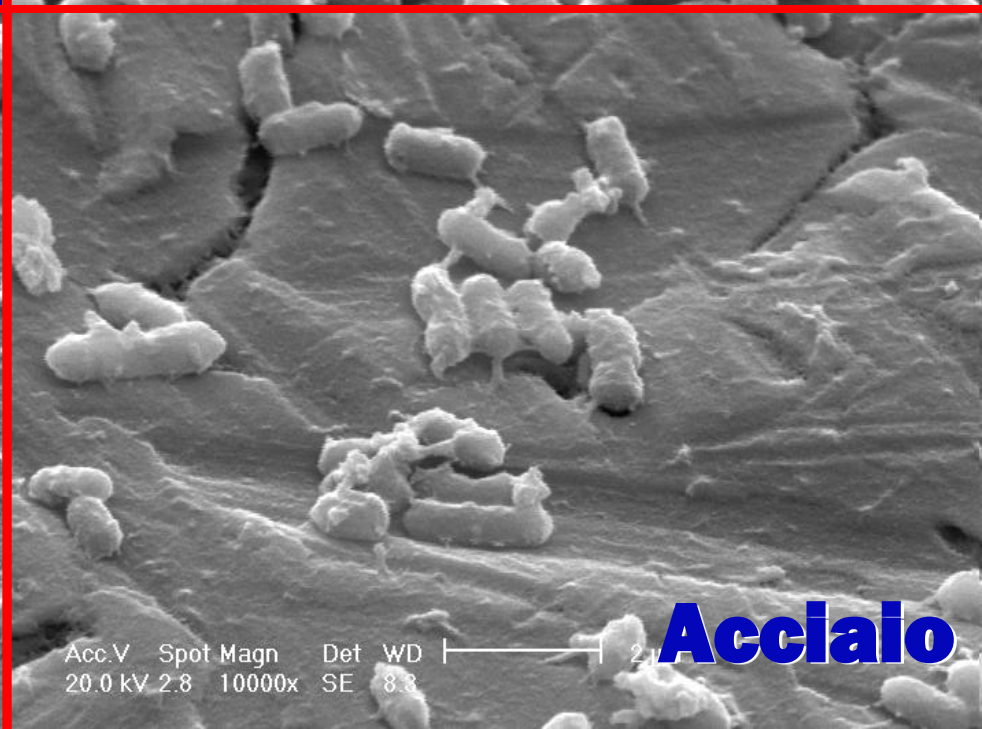
Polipropilene

Acciaio inossidabile

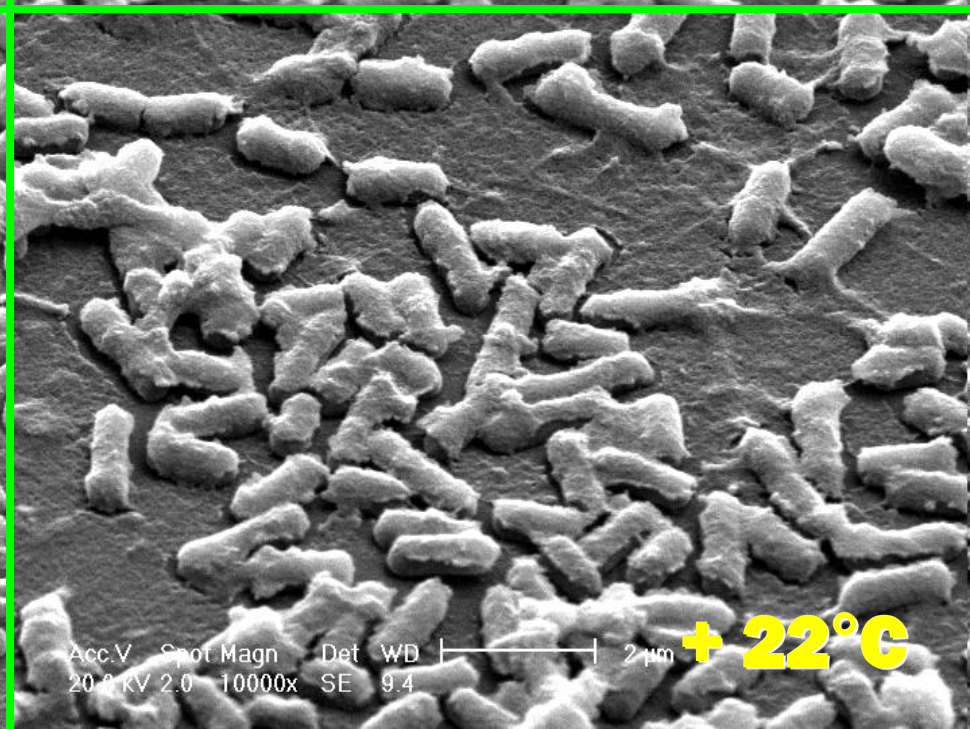
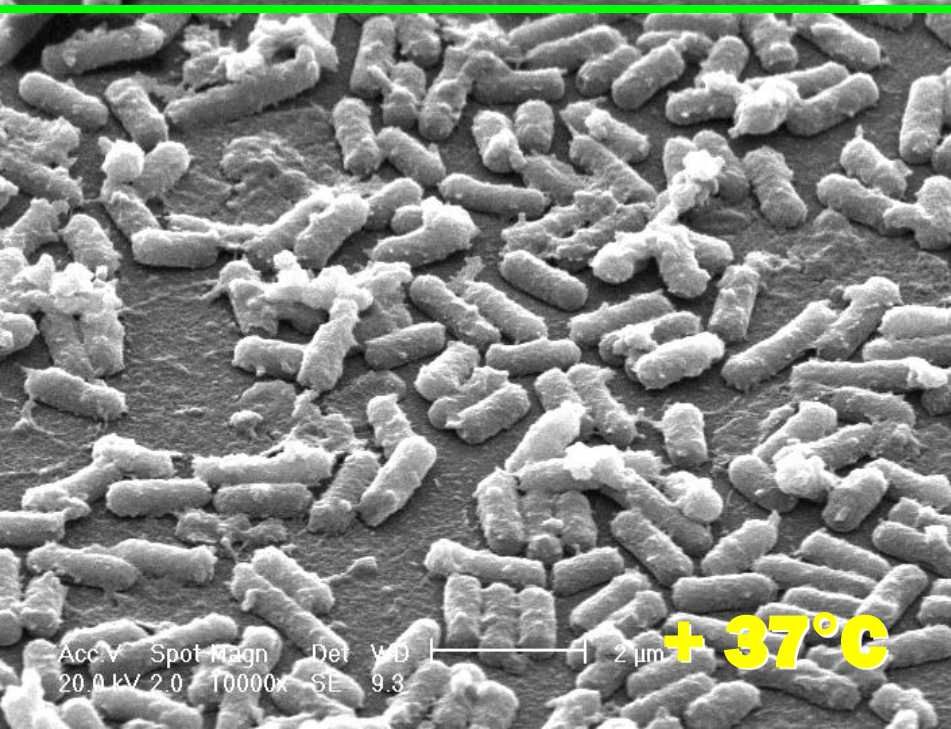
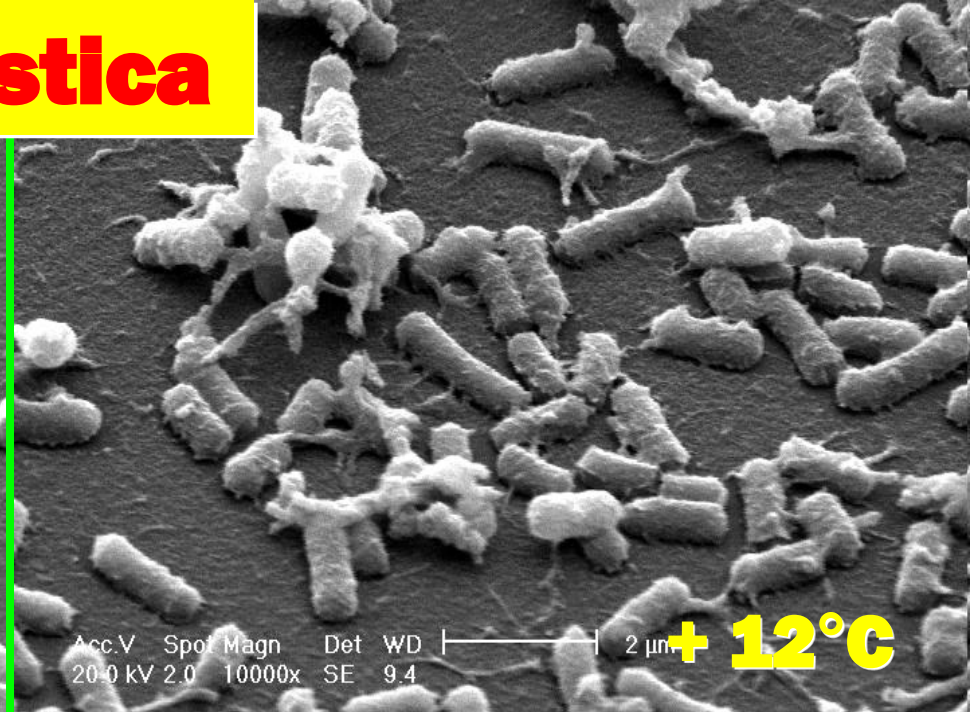
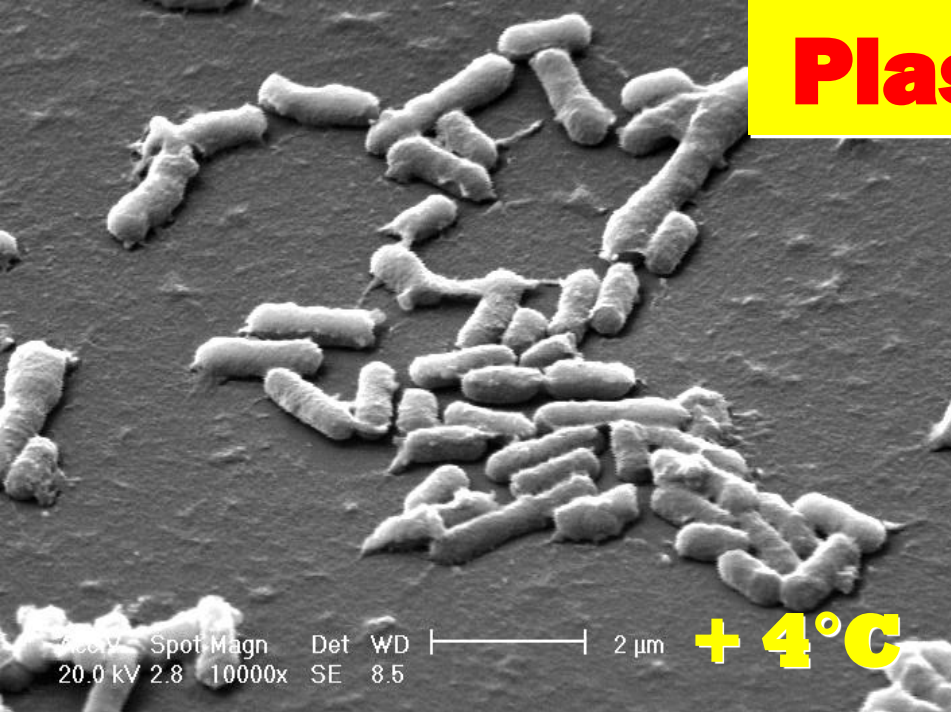
Bassa

Vetro

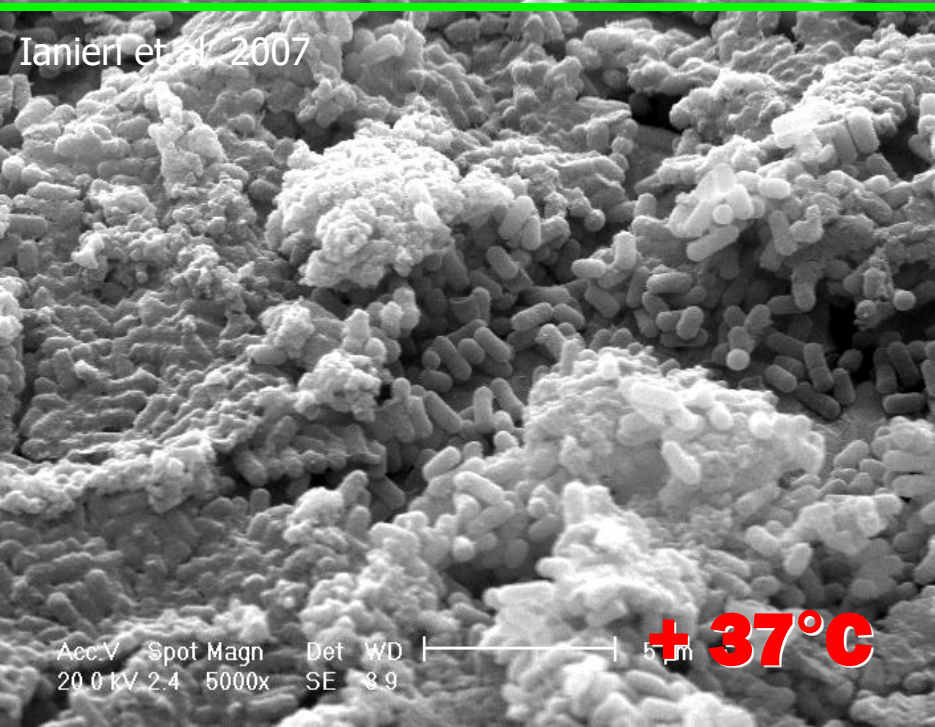
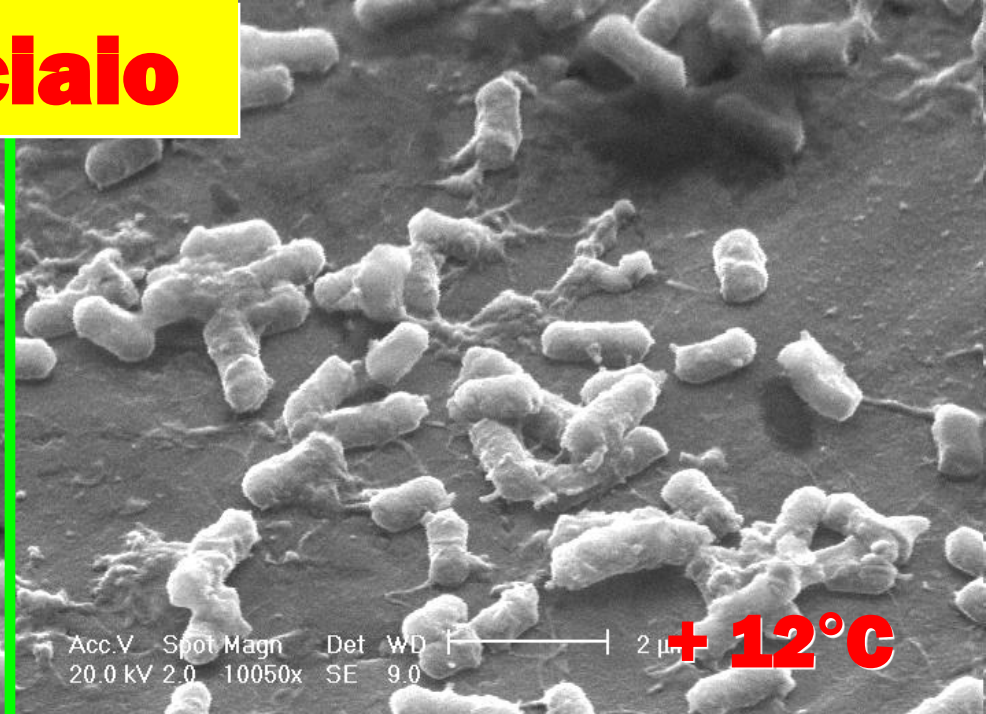
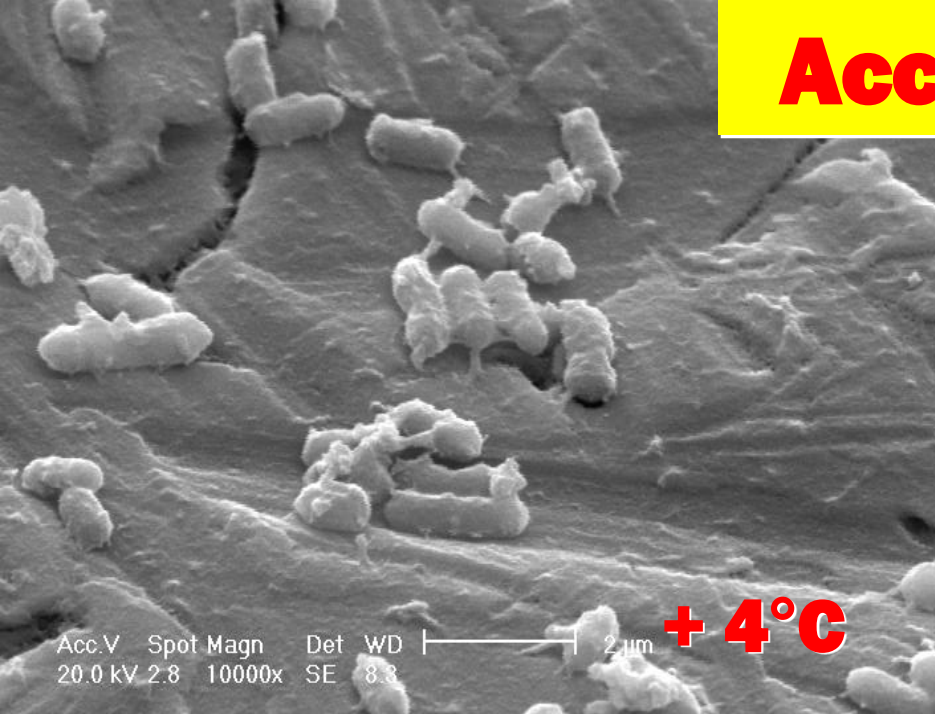
Scansione al microscopio elettronico



Plastica



Acciaio



Ianieri et al. 2007





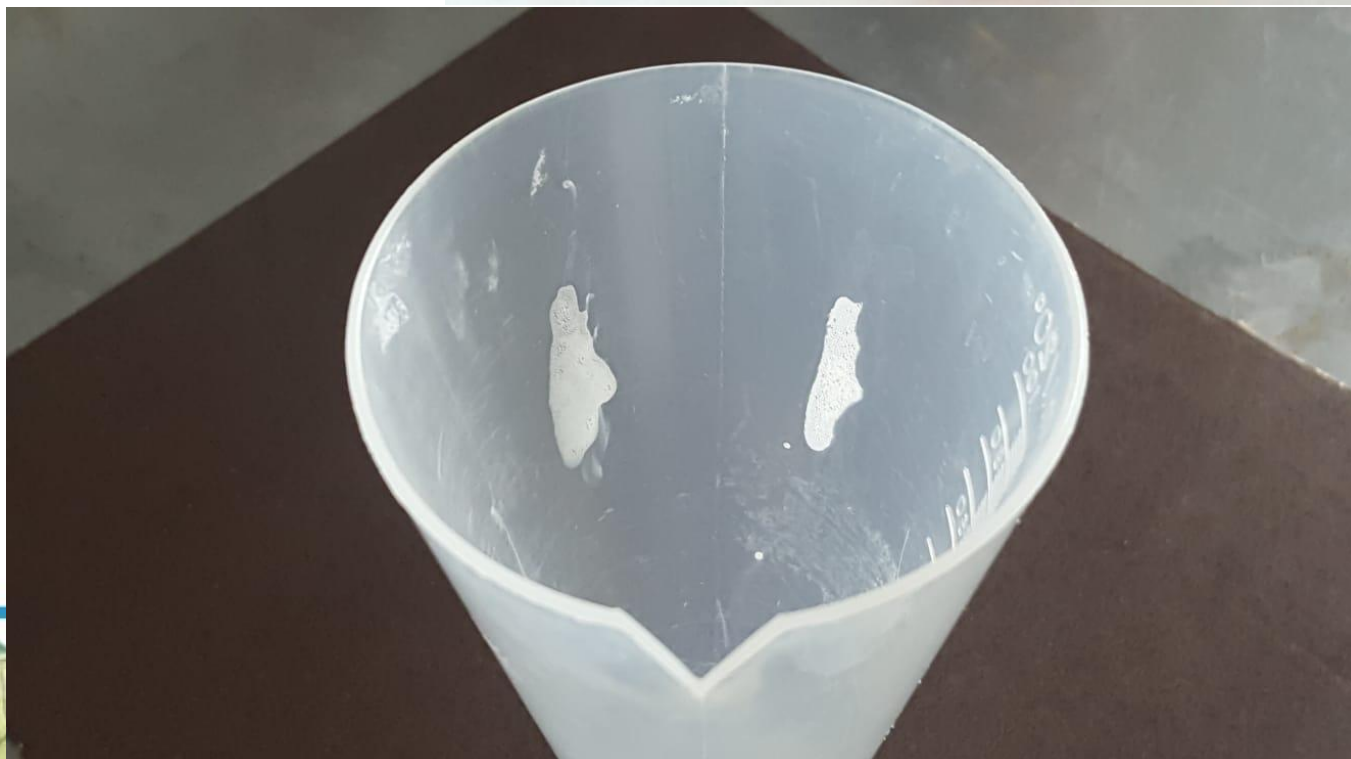
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Modalità di evidenziazione diretta sulle Superfici di materiale organico o biofilm

- Ispezione visiva (materiale organico)
- Coloranti come l'**Eritrosina** (E127) che presenta affinità per proteine e lipidi, si lega anche agli esopolisaccaridi nei biofilm
- Bioluminescenza
- Test basati sulla rilevazione della catalasi nel caso di germi produttori dell'enzima catalasi



Test della catalasi



e campioni ambientali

1. Caldaia di coagulazione del latte
2. Spino metallico per la rottura della cagliata
3. Vasca di fermentazione
4. Macchina di filatura
5. Formatrice



Studi che possono essere condotti dall'OSA per dimostrare, con soddisfazione dell'Autorità Competente, che il prodotto non supera il limite di 100 ufc/g durante il periodo di conservabilità:

dimostrazione che *non esiste rischio di contaminazione da Listeria monocytogenes* (esiti di analisi nelle varie fasi di produzione e sul prodotto finito per la validazione del processo);

***caratteristiche fisico-chimiche del prodotto*, quali pH, Aw, contenuto salino, concentrazione di conservanti e tipo di sistema di confezionamento, validate mediante analisi (anche provenienti da clienti e autorità pubbliche) che dimostrano il mantenimento durante il periodo di conservabilità di un livello ≤ 100 ufg/g;**

consultazione della *letteratura scientifica disponibile* e dei dati di ricerca sulle caratteristiche di sviluppo e di sopravvivenza del microrganismo;

Studi che possono essere condotti dall'OSA per dimostrare, con soddisfazione dell'Autorità Competente, che il prodotto non supera il limite di 100 ufc/g durante il periodo di conservabilità:

modelli matematici predittivi stabiliti per il prodotto alimentare in esame, utilizzando fattori critici di sviluppo o di sopravvivenza di *Listeria*;

prove per determinare la capacità di *Listeria*, debitamente inoculata, di svilupparsi o sopravvivere nel prodotto in diverse condizioni di conservazione ragionevolmente prevedibili (challenge test);

studi per valutare lo sviluppo o la sopravvivenza di *Listeria* durante il periodo di **conservabilità**, in condizioni ragionevolmente prevedibili di distribuzione, conservazione e uso.

Microbiologia predittiva

La microbiologia predittiva si basa sulla premessa che le popolazioni microbiche rispondono **in maniera riproducibile** in termini **di crescita, morte o sopravvivenza** al variare dei **fattori ambientali presenti negli alimenti**.

Nel corso della nostra attività abbiamo utilizzato modelli predittivi classificati da Buchanan (1993) primari, secondari e terziari che ci hanno permesso per i microorganismi considerati, di verificare

- ✓ l'andamento della crescita microbica in funzione del tempo, stimare i parametri di crescita (lag fase, tasso di crescita, N_{max}),
- ✓ mettere in relazione i parametri di crescita con la variazione del fattore ambientale temperatura e convertendo questi parametri in algoritmi e combinandoli tra loro in software



Data Set 1

File:	MONO.csv

Parameter Estimates

N0	2.07	+/-	0.26
Nmax	8.68	+/-	0.26
mumax	1.30	+/-	0.07
t-lag	-0.26	+/-	0.63
t-d	0.53	+/-	0.04
RSS	0.41	RMS	0.20

GIORNO	LOG
0	2.14
1	2.43
2	3.19
3	4.07
4	4.91
8	6.58
9	7.1
10	7.87
11	8.31
14	8.64

Browse ...

Clear

Fit Model

Graph

- ☒ Data
☒ Model
☐ Asymptotes

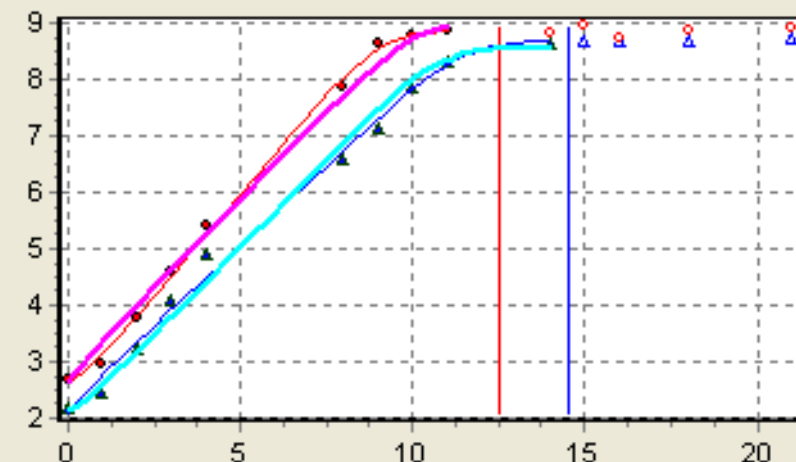
Data Selection Control

☐ Full ☒ Partial ☒ Cursor
 Use 10 of 14 points

Reference Model

N0	3.00	0.00	6.00
Nmax	8.00	6.00	10.00
mumax	1.00	0.00	5.00
t-lag	5.00	0.00	10.00

t-d 0.69 ☐ Show Ref. ☐ Asymptotes Maximum Time 25.00



Unified Model

Compare	Explain	Test for...	Set 1	Set 2
☒ Display Model		☐ N0	2.10	2.60
F-Statistic 11.14		☐ Nmax	8.56	9.06
Significant (p=0.006)		☒ mumax	1.43	1.43
		☐ t-lag	0.31	-0.25
		t-d	0.48	0.48

Data Set 2

File:	INNOCUA.csv

Parameter Estimates

N0	2.62	+/-	0.14
Nmax	8.86	+/-	0.12
mumax	1.66	+/-	0.07
t-lag	0.41	+/-	0.30
t-d	0.42	+/-	0.03
RSS	0.11	RMS	0.11

GIORNO	LOG
0	2.68
1	2.94
2	3.76
3	4.57
4	5.37
8	7.85
9	8.64
10	8.75
11	8.83
14	8.8

Browse ...

Clear

Fit Model

Graph

- ☒ Data
☒ Model
☐ Asymptotes

Data Selection Control

☐ Full ☒ Partial ☒ Cursor
 Use 9 of 14 points



ComBase Predictor

☒ Growth model
☐ Thermal inactivation model
☐ Non thermal survival model

Temperature input

☒ Static ☐ Changing temperature

Water activity

☐ NaCl ☒ Aw

Observation duration

Time (h)

Listeria monocytogenes/innocua with CO₂

Initial level	Phys.state	T (°C)	pH	Aw	CO ₂ (%)	Max.rate (log conc/h)	Dbl.time (h)
<=7	[0-1]	[1-40]	[4.4-7.5]	[0.934-1]	[0-100]		
-1.4	1	8	7	0.988	0	0.04	8.37

Predict

Predictions

time(h)	conc.(Log10 cell/g)
0.00	-1.40
0.00	-1.40
4.80	-1.23
9.60	-1.05
14.40	-0.88
19.20	-0.71
24.00	-0.54
28.80	-0.36
33.60	-0.19
38.40	-0.02
43.20	0.15

Dalla predizione a 8° C si ottiene un $\mu_{\max} / h = 0,04 \text{ LOG}$, che è = 0.96 LOG al giorno, mentre la predizione con la formula $\mu_{\max}$ da un valore = 0.98 LOG

		ln	log 10
8	$\mu_{\max T1(\text{Ref})} = A$	2.26	0.98
°C	x		

The Pathogen Modeling Program (<http://pmp.arserrc.gov/PMPHome.aspx>);
 SymPrevious (<http://www.symprevius.net/>);
 Seafood Spoilage and Safety Predictor (<http://sssp.dtuaqua.dk/>);
 ComBase <http://www.combase.cc/index.php/en>).



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M.

Si stima che nel 2050 la popolazione mondiale arriverà a contare circa 9,7 miliardi di persone.

Produrre cibo sufficiente per tutti sarà una delle sfide più difficili.

Per superarla, i sistemi di produzione alimentare dovranno essere estremamente efficienti: filiere in grado di produrre cibo sicuro e nutriente, riducendo al tempo stesso in modo deciso l'impatto ambientale.

