

Listeria monocytogenes

Batterio Gram positivo che si presenta come un bacillo corto, flagellato ed asporigeno, capace di formare biofilm sulla superficie colonizzata. È un microrganismo anaerobio facoltativo, psicotrofico, capace di crescere in un ampio range di temperatura e di pH, e resistente ad elevate concentrazioni saline e a diversi agenti chimici: queste caratteristiche ne fanno un germe ubiquitario.

Listeria monocytogenes è l'agente eziologico della listeriosi, infezione che può manifestarsi con diverse sintomatologie, anche molto gravi, che l'uomo può contrarre perlopiù per via alimentare, ma raramente anche per contatto con soggetti o animali infetti.

La malattia si manifesta inizialmente con una sintomatologia di tipo gastro – intestinale, che solitamente si risolve in qualche giorno, ma nei soggetti più deboli può evolvere in un'infezione sistemica caratterizzata da encefaliti e sepsi, e dall'elevato tasso di mortalità (Hilliard et al., 2018).

Le donne gravide sono invece soggette alla listeriosi perinatale, che si manifesta con una sindrome simil – influenzale, ma che causa danni neurologici al feto ed eventualmente l'aborto. Nell'Unione Europea è stato stimato un tasso di mortalità del 15.6% (EFSA, 2019): la morte si verifica perlopiù in soggetti appartenenti a categorie più sensibili, quali bambini, anziani ed immunodepressi. Fino agli anni '80 Listeria monocytogenes era stata considerata quasi esclusivamente un problema di interesse veterinario. In seguito ad alcune epidemie negli USA, si comprese la sua patogenicità per l'uomo e l'importanza della trasmissione alimentare. Negli ultimi anni l'incidenza della listeriosi è costantemente in aumento nei paesi industrializzati: nel 2018 nell'Unione Europea sono stati accertati 2549 casi (0,47 ogni 100.000 abitanti), quasi il 50% in più rispetto al 2012, di cui 178 in Italia (0,29 ogni 100.000 abitanti) (EFSA, 2019). Tale incremento può essere imputabile in gran parte all'aumento del consumo di cibi pronti e all'aumento dei soggetti immunodepressi,

ma sicuramente sul dato influisce anche l'affinamento delle tecniche diagnostiche. *Listeria monocytogenes* è un germe ubiquitario, capace di crescere sia nell'intestino dell'uomo e degli animali, sia nell'ambiente, ove resiste a lungo anche in condizioni avverse, quali bassa temperatura ed elevata concentrazione salina.

L'uomo può introdurre il batterio perlopiù per via alimentare: la sua elevata adattabilità gli consente di contaminare una grande varietà di alimenti, ma quelli considerati più a rischio sono latte crudo, pesce affumicato, salsicce e pollame. I trattamenti termici, quali la pastorizzazione del latte e la cottura degli alimenti, uccidono il microrganismo che però, riuscendo a svilupparsi nell'ambiente e a formare biofilm, può colonizzare superfici (comprese quelle del frigorifero) e altri oggetti che vengono a contatto con alimenti pronti all'uso: per questo motivo è importantissima la sanificazione di stoviglie e superfici entrate in contatto con gli alimenti potenzialmente contaminati. I soggetti più a rischio, come le donne in gravidanza, devono comunque evitare il consumo degli alimenti più pericolosi.

La normativa europea include il batterio tra i criteri di sicurezza degli alimenti: l'allegato I al Regolamento (CE) 2073/2005 definisce i limiti di *Listeria monocytogenes* negli alimenti. Il batterio non deve superare 100 UFC/g nei prodotti con caratteristiche tali da non favorirne la crescita, immessi sul mercato nel periodo di conservabilità. Tale criterio si applica anche agli alimenti che costituiscono terreno fertile per la crescita di *Listeria monocytogenes* qualora l'Operatore del Settore Alimentare (OSA) dimostri all'autorità competente che tale limite non sia superato durante il periodo di conservabilità, mentre in caso contrario ne è imposta l'assenza in 25 grammi. Il microrganismo deve essere sempre assente anche negli alimenti per lattanti. Lo stesso regolamento stabilisce inoltre che gli OSA produttori di alimenti pronti all'uso nei quali può svilupparsi *Listeria monocytogenes*, e pertanto potenzialmente pericolosi per la salute pubblica, nell'ambito del loro piano di

campionamento procedano al prelievo di campioni dalle aree di lavorazione e dalle attrezzature per la ricerca del microrganismo.

La strategia di minimizzazione del rischio in stalla e in caseificio: prevenzione, sempre

All'interno di **allevamenti di animali da latte**, le principali fonti di contaminazione sono **suolo, acqua e alimenti zootecnici** (Sauders & Wiedmann, 2007), ma anche la **contaminazione fecale**.

Vi sono alcune strategie da adottare per evitare di riportare in stalla il batterio e, quindi, di contaminare il latte che si raccoglie. Oltre a intervenire con **procedure di pulizia** in stalla, è importante la **corretta gestione di liquami e letame** che s'intende sfruttare per la **concimazione del suolo**. Infatti, la **maturazione del letame** può portare all'inattivazione dei patogeni contaminanti; lo spargimento di letame fresco o minimamente trattato direttamente sui terreni coltivati aumenta il rischio di trasferimento di *L. monocytogenes* alla fase post-agricola (Santorum et al., 2007). Il fatto che *Listeria* non sopravviva per più di un mese in letame tenuto in cumuli, nei quali le temperature salgono sopra i 55 °C (EFSA, 2009a; Kim & Jiang, 2010), è un vantaggio utile ad evitare spargimento di concime contaminato in campo. Le deiezioni animali contenenti qualsiasi forma di lettiera hanno una minor prevalenza di *Listeria* spp. (Hutchison et al., 2005a). Pertanto, l'uso della lettiera come trattamento del letame è una misura di controllo semplice che potrebbe essere raccomandata per il controllo di *L. monocytogenes* in azienda agricola.

L'uso di concimi da deiezioni animali contaminati può riportare di nuovo il rischio microbiologico in stalla. Il **foraggio contaminato** porta il microrganismo di nuovo nell'intestino degli animali, creando così un circolo che sostiene la sua presenza in ambiente agricolo e ne favorisce la diffusione. *Listeria* spp. è tendenzialmente anaerobia capace di buona resistenza, sopravvivendo bene all'esterno dell'organismo animale (Giaccone et al., 2013). Il fatto che il batterio trovi una nicchia di sviluppo preferenziale nei substrati dove c'è una certa anaerobiosi, come gli insilati, è una criticità anche per quanto riguarda gli alimenti zootecnici. Prediligendo condizioni di pH neutro o poco acido, va precisato che non tutti gli insilati sono a rischio, ma solo quelli mal fermentati, con una non perfetta fermentazione lattica ed un pH superiore a 5 (Giaccone et al., 2013). I ruminanti al **pascolo** hanno una prevalenza inferiore di *L. monocytogenes* nei campioni fecali rispetto agli animali alimentati con insilati (Sauders e Wiedmann, 2007; Wesley, 2007). Tutto questo ci fa capire che una buona gestione dei suoli coltivati e dell'utilizzo dei concimi ottenuti da deiezioni animali è fondamentale per il controllo del batterio.

Va poi ricordata l'importanza dell'igiene in **fase di mungitura**: la contaminazione infatti può avvenire nei locali dedicati a mungitura e sala d'attesa, che dovranno essere lavati e puliti dopo ogni mungitura. In mungitura meccanica, il passaggio dei gruppi di mungitura da una vacca all'altra può costituire una grave fonte di contaminazione e diffusione di batteri tra i diversi animali. Per affrontare il problema, l'immersione del gruppo di mungitura in un secchio contenente acqua e disinfettante che in seguito deve essere risciacquato con solo acqua può essere un approccio utile, tuttavia è una soluzione adottabile in allevamenti molto piccoli con personale responsabile che esegue correttamente le diverse operazioni. In alternativa, si può provvedere all'installazione, sui gruppi di mungitura, del backflushing che

permette la disinfezione automatica dei gruppi di mungitura dopo il processo eseguito da una vacca all'altra, e la successiva asciugatura interna delle guaine (Granlatte).

Un'altra criticità legata a *L. monocytogenes* è la **capacità di formare biofilm** (Latorre et al., 2010), ovvero aggregati multi-cellulari di batteri, difficili da eliminare, che possono crearsi su pavimenti, pareti, attrezzature e, in particolare, su superfici porose. Prevenire la formazione di biofilm è quindi fondamentale. Inoltre, la contaminazione dei prodotti può avvenire in qualsiasi fase della produzione, anche se la pastorizzazione del latte per la trasformazione è avvenuta correttamente. Essendo molti i veicoli per questo batterio, la contaminazione dei prodotti lattiero-caseari può avvenire anche a monte del processo di pastorizzazione.

Nei **locali di trasformazione del latte** vanno attivate e mantenute **procedure standard di igiene elevate**, soprattutto negli impianti in cui la struttura "in avanti" del flusso produttivo non è stata realizzata e, pertanto, non vi è netta separazione tra locali produttivi, stoccaggio, zone di lavaggio delle attrezzature, etc. Poter controllare il rischio in locali progettati secondo la vecchia concezione per cui non si ha separazione tra le varie aree di lavoro può essere molto complicato.

Le **fonti di contaminazione per i prodotti lattiero-caseari** sono sia all'interno che all'esterno dell'ambiente di produzione. Il **personale** può essere vettore con scarpe, vestiti, veicoli, etc., ma lo sono anche l'aria, gli animali (uccelli, roditori, insetti) che sfuggono ai sistemi di prevenzione del loro ingresso in area produttiva. Tutto ciò che entra a contatto con la lavorazione, dagli ingredienti forniti da altre aziende fino all'attrezzatura non correttamente pulita, può essere veicolo di contaminazione. Alcuni ambienti nell'area di produzione, inoltre, possono diventare nicchie di sviluppo per *L. monocytogenes*: è vero per muri, suoli, zone intorno agli scarichi e sotto i piani di lavorazione, ventilatori ed umidificatori, spugne e spazzole per il lavaggio della crosta, scope e materiale per la pulizia. Infine, grande attenzione va posta alla **gestione delle salamoie**, ricordando la capacità del batterio di sopravvivere a elevata salinità. Per la **prevenzione**, ci sono alcuni elementi chiave da ricordare (ed applicare):

- la **pastorizzazione del latte** va correttamente eseguita e va verificato che essa abbia avuto successo. La pastorizzazione può essere ottenuta con un trattamento a temperatura elevata durante un breve periodo (almeno 72 °C per 15 s), temperatura moderata durante un lungo periodo (almeno 63 °C per 30 min) oppure ogni altra combinazione tempo-temperatura che permetta di ottenere un effetto equivalente. L'operatore deve verificare che il trattamento abbia avuto successo: in tal senso, la determinazione dell'attività della fosfatasi alcalina nel latte è considerata il principale indicatore di una corretta pastorizzazione e l'esito dell'analisi deve essere negativo per confermare la buona riuscita del trattamento [Reg. (CE) n. 2074/2005].
- Va assicurata un'**efficace pulizia di tutte le superfici a contatto prima della lavorazione**; per fare questo, è necessario predisporre una procedura di sanificazione adeguata, per contrastare la formazione di biofilm e nicchie. Lo stesso vale per le attrezzature da lavoro, da sottoporre a idoneo lavaggio, utilizzando sempre detergenti, detersivi e disinfettanti a basso impatto ambientale, inodori, facilmente risciacquabili e, chiaramente, adeguati alla buona riuscita dell'operazione;
- L'**ambiente interno deve essere opportunamente isolato rispetto all'esterno**, al fine di prevenire contaminazioni esterne indesiderate (ad es., l'ingresso di aerosol assenza di impianti di ventilazione o non corretto isolamento di finestre, porte, uscite da e verso l'impianto). È fondamentale che l'**accesso all'impianto sia limitato agli**

- addetti alla produzione** e che, in caso di necessario intervento di personale esterno (verifiche ispettive, audit, etc.), vengano prese le dovute precauzioni facendo indossare gli indumenti protettivi e imponendo di lasciare qualsiasi oggetto personale (telefoni cellulari, penne, orecchini, etc.) fuori dall'area di produzione;
- assicurarsi che gli **addetti alla produzione** siano stati **preparati ed educati alle buone pratiche di igiene**, così come verificare che essi le mantengano, compresi il **cambio degli indumenti** e degli stivali esterni e il lavaggio delle mani, prima di entrare nell'impianto di lavorazione. Inoltre, anche il lavaggio degli indumenti andrebbe controllato, evitando che siano gli operatori stessi ad eseguirlo (come possiamo essere sicuri che la divisa non venga lavata insieme ad altri indumenti e che il lavaggio sia efficace? Se gli indumenti sono esposti all'aperto, chi assicura che animali non passino e non vadano a toccare gli indumenti?);
 - **rispettare la catena del freddo**, dal momento in cui il latte viene munto in poi;
 - **separare aree ed attrezzature per la movimentazione di latte crudo** (ad esempio spazzole, guarnizioni, raccordi, tubazioni, serbatoi) **da aree e attrezzature utilizzate per il prodotto pastorizzato** e, quindi, prevenire la contaminazione crociata del latte crudo con quello pastorizzato.

Per quanto riguarda i **prodotti a latte crudo**, in Europa si ammette il suo utilizzo per formaggi con stagionatura superiore a 60 giorni. Tuttavia, questo limite non è sinonimo di sicurezza poiché la carica microbica totale potrebbe essere ancora molto elevata. L'ideale è portare la stagionatura fino a 180 giorni e, al contempo, avere all'interno del processo operazioni che contribuiscano a ridurre la carica microbica, come cottura della pasta e filatura. La cottura della pasta, abbinata alla lunga stagionatura, è una pratica che comporta una riduzione considerevole della microflora nel corso della maturazione, così come la filatura. *L. monocytogenes* è problematica nei **formaggi erborinati, a crosta lavata o fiorita** che, indipendentemente dal fatto che sia stato utilizzato o meno latte pastorizzato correttamente, possono essere oggetto di una contaminazione ambientale a livello della crosta: a causa dell'intenso metabolismo delle muffe, si ha un innalzamento di pH durante la maturazione e questo porta, in presenza di contaminazione, ad una crescita del batterio (Mucchetti e Neviani, 2006).

Infine, il rischio è elevato soprattutto per i **formaggi freschi e molli**: per questo motivo va utilizzato latte pastorizzato e va posta la massima cura nell'igiene delle salamoie, nella contaminazione degli ambienti di stagionatura e nelle manipolazioni in fase di toelettatura e confezionamento per evitare la ricontaminazione con *L. monocytogenes*, oltre ad eventuali difetti nella pasta. In particolare, i passaggi critici sono **spugnature e lavaggi in formaggi a crosta lavata**, svolti per favorire una selezione della microflora superficiale, in genere composta da *Micrococcaceae* e *Corynebacteriaceae* che caratterizzano il prodotto con una **colorazione rossastra** e partecipano ai **fenomeni di maturazione del sottocrosta**: condizioni di umidità della crosta, aerobiosi e selezione alofila contribuiscono all'attecchimento di *L. monocytogenes*. È per questi motivi che alcuni formaggi tipici, come il Gorgonzola, prevedono la non edibilità della crosta (Mucchetti e Neviani, 2006).

Bibliografia

BC Centre for Disease Control, Canada 2017. Dairy Food Safety Fact Sheet: *Listeria* in Dairy Plants

EFSA, 2009a. Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from the European Commission on food safety aspects of dairy cow housing and husbandry systems. EFSA J 1189: 1-27.

Fox E., O'Mahony T., Clancy M., Dempsey R., O'Brien M., Jordan K., 2009. *Listeria monocytogenes* in the Irish dairy farm environment. J Food Prot 72: 1450-1456.

García R., Martínez-Suárez J.V., López-Alonso V., 2012. Review. Dairy farm management and production practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in raw milk and beef SPANISH JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH

Giaccone V., Bertoja G., 2013. *Listeria* e listeriosi nella filiera latte: breve rassegna critica. Large Animal Review 2013; 19: 280-286

Granlatte, Manuale per la produzione di latte certificato di alta qualità e biologico.

Hutchison ML, Walters LD, Avery SM, Munro F, Moore A, 2005a. Analyses of livestock production, waste storage, and pathogen levels and prevalences in farm manures. Appl Environ Microbiol 71: 1231-1236.

Kim J., Jiang X., 2010. The growth potential of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in dairy manure-based compost in a greenhouse setting under different seasons. J Appl Microbiol 109: 2095-2104.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, 2018. Listeriosi.

Latorre AA, Van Kessel JS, Karns JS, et al. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. J Dairy Sci. 2010 Jun;93(6):2792-802.

Mucchetti G., Neviani E., 2006. Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia. Qualità e sicurezza – Tecniche Nuove

Santorum P., Garcia R., Fernandez B., 2007. Seasonal changes of zoonotic agents presence in dairy manure of modern and traditional farms. Proc. XIII International Congress in Animal Hygiene. Tartu, Estonia, June 17-21. pp: 915-920.

Sauders B. D., Wiedmann M., 2007. Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. In: *Listeria, listeriosis and food safety* (Ryser ET, Marth EH, eds). CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

The Rapid Alert System for Food and Feed, 2017. Annual Report

Wesley I., 2007. Listeriosis in animals. In: *Listeria, listeriosis and food safety* (Ryser ET, Marth EH, eds). CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp: 55-84.