

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in  
“Disciplina nazionale ed europea sulla produzione ed  
il controllo degli alimenti”

Ciclo XXI

“Aspetti igienico-sanitari del latte crudo destinato  
alla vendita diretta: ricerca di  
*Listeria monocytogenes*”

Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. Franco Brindani

Tutor:  
Chiar.mo Prof.ssa Cristina Bacci

Dottorando: Elisa Riboldi

*Ai miei figli  
Riccardo e ..... ,  
fonte di gioia ogni giorno*

## Indice

<b>1. Introduzione</b>	<b>1</b>
1.1 Composizione del latte	3
1.2 Caratteristiche nutrizionali	4
1.3 Normativa	5
1.4 Listeriosi	8
1.5 <i>Listeria monocytogenes</i>	13
<b>2. Materiali e metodi</b>	<b>17</b>
2.1 Ricerca di <i>Listeria monocytogenes</i> in latte crudo	17
2.2 Protocollo sperimentale	22
2.3 Carico microbico mesofilo	22
2.4 Determinazione del pH	23
<b>3. Risultati</b>	<b>24</b>
3.1 Ricerca di <i>Listeria monocytogenes</i> in latte crudo, mediante conta diretta	24
3.2 Ricerca di <i>Listeria monocytogenes</i> in latte crudo, con metodo MPN	26
3.3 Ricerca di <i>Listeria monocytogenes</i> in latte crudo inoculato, mediante conta diretta	28
3.4 Ricerca di <i>Listeria monocytogenes</i> in latte crudo inoculato, con metodo MPN	36
3.5 Carico microbico mesofilo aerobio	42
3.6 Valutazione del pH	45
<b>4. Conclusioni e discussioni</b>	<b>46</b>
<b>5. Bibliografia</b>	<b>52</b>

## 1. Introduzione

Il latte crudo è un alimento che può essere definito allo stato naturale in quanto dopo la mungitura non subisce alcun trattamento ad eccezione della filtrazione. Esso non è da confondere con il latte fresco che viene pastorizzato e quindi sottoposto a trattamento termico ad alta temperatura per brevissimo tempo (72° C per 15 secondi).



**Fig. 1:** non è un caso solo nazionale (<http://www.ecoliblog.com/rawmilk>)



**Fig. 2:** esempio di distributore automatico di latte crudo (<http://www.arsalimentaria.it>)

La vendita diretta di latte crudo, nuovamente consentita in Italia a partire dal 2004, è stato un fenomeno che si è evoluto rapidamente. A tutt'oggi sul territorio italiano esistono 1348 distributori di "latte crudo alla spina" dislocati in 85 province (51 in Emilia Romagna e 199 in Lombardia) (<http://www.milkmaps.com>). La commercializzazione di questo prodotto si è resa immediatamente interessante agli occhi del consumatore, consentendone quindi una grande diffusione, essenzialmente per due motivi. Innanzitutto la riduzione del prezzo di mercato, in quanto la produzione di latte crudo non richiede alcun trattamento post-mungitura, e la vendita diretta produttore-consumatore elimina i costi di filiera, che caratterizzano la grande distribuzione. In secondo luogo, il pubblico rivolge sempre più l'attenzione ai prodotti così detti "naturali". La rapida diffusione di questa tipologia di alimento sul mercato ha diviso la stampa e i diversi canali mediatici in opinioni molto spesso contrastanti: favorevoli per la genuinità del prodotto, per la riduzione del costo di mercato e dell'impatto ambientale; sfavorevoli perché non bisogna dimenticare che già nell'ottocento erano conosciute le patologie legate al consumo di latte crudo. Nel 1929 in Italia venne imposta con un Regio

Decreto la pastorizzazione del latte allo scopo di ridurre la mortalità di bambini e adolescenti come era stato dimostrato in Inghilterra, adottando questo provvedimento trent'anni prima.

MERCOLEDÌ  
3 DICEMBRE 2008

# il caso

---

## **Latte crudo, la moda porta in ospedale**

ADDIO PASTEUR. L'ultima tendenza è bere latte non pasteurizzato. A Legnago una bimba di tre anni è stata dodici giorni in terapia intensiva per aver contratto l'Escherichia coli. Pur-troppo manca una normativa chiara delle regioni in materia.

DI ANNA MELDOLESI

Fig. 3: da Il Riformista nord mercoledì 3 dicembre 2008

**12 Dicembre 2008**

## **Latte crudo e informazione bollita**

E', infatti, necessario ricordare che il latte nella mammella è sterile ma può essere contaminato da batteri presenti nel tratto finale del dotto lattifero (streptococchi, stafilococchi, corinebatteri, micrococchi, lattobacilli) o da patogeni che causano infezioni asintomatiche nelle bovine da latte, o ancora da batteri di provenienza bovina o umana che raggiungono l'epidermide mammaria o il latte durante le operazioni di mungitura attraverso il pelo, gli escrementi, le attrezzature, i mangimi, l'ambiente. Ne deriva che nel latte crudo si possono ritrovare insieme a microrganismi che svolgono nell'uomo funzioni metaboliche importanti

anche portatori di patologie, tra i quali *L. monocytogenes* (Fernandez-Garayzabal J. F. *et al.*, 1987). Non mancano quindi perplessità relative la sicurezza e la salubrità del latte crudo venduto direttamente dalla stalla al consumatore. In particolar modo sono state messe in luce serie problematiche per le fasce di consumatori più sensibili, quali bambini, donne in stato di gravidanza, anziani e soggetti immunocompromessi (Landini M.P., 2009).

Dovendo essere, le bovine da latte, certificate esenti da mastite, tubercolosi, brucellosi, l'attenzione della sanità pubblica si è rivolta soprattutto a tre microrganismi responsabili di serie infezioni per l'uomo: *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*. Alla luce di quanto detto l'indagine condotta si è rivolta alla ricerca di *Listeria monocytogenes* nel latte crudo tal quale e nella stessa matrice artificialmente contaminata, saggiando due diverse metodiche a confronto:

- NORMA UNI EN ISO 11290-1 e 2:2005 (Regolamento (CE) n. 2073/2005)
- Metodo MPN (Most Probable Number)

E' stata effettuata, inoltre, una valutazione microbiologica del latte crudo prelevato da diversi distributori sul territorio emiliano e lombardo, attraverso la stima del carico microbico aerobio totale secondo la NORMA ISO 4833:2004 in riferimento al Regolamento (CE) n. 853/2004 e alle relative Circolari regionali.

### 1.1 Composizione del latte



Fig. 5: il latte (<http://www.medicinalive.com>)

Il latte è un liquido biologico contenente soprattutto acqua, la quale funge da solvente per zuccheri, sostanze azotate semplici, vitamine idrosolubili e alcuni sali minerali; i grassi e le vitamine liposolubili sono allo stato di emulsione; le proteine e altri sali minerali (fosfati) allo stato di soluzione colloidale; cellule e microrganismi si trovano in sospensione.

Le diverse fasi tendono a separarsi, tanto che nel latte appena munto, lasciato a riposo, il grasso affiora dopo qualche ora (Cappelli P., Vannucchi V., 2000).

### **Componenti del latte:**

<b>COMPONENTE</b>	<b>(%)</b>
<b>Acqua</b>	<b>87,5</b>
<b>Zuccheri</b>	<b>4,9</b>
<b>Lipidi</b>	<b>3,5</b>
<b>Sostanze azotate</b>	<b>3,4</b>
Azoto proteico	95,5
Azoto non proteico	4,5
<b>Sali minerali</b>	<b>0,93</b>

**Tab. 1: componenti del latte (Sicheri G., 1994)**

### **Proprietà chimico-fisiche:**

<b>PROPRIETA'</b>	<b>VALORE</b>
pH	6,5 ÷ 6,7
Acidità	6,0 ÷ 8,0 °SH
Densità (15 °C)	1,029 ÷ 1,034
Viscosità (15 °C)	0,0212 ÷ 0,0254
Punto di congelamento	- 0,55 ÷ (- 0,56) °C
Punto di ebollizione	100,15 ÷ 100,17 °C

**Tab. 2: proprietà chimico-fisiche del latte**

## **1.2 Caratteristiche nutrizionali**

Il latte è considerato un alimento completo per il neonato e quasi completo per l'adulto, ha una composizione equilibrata, senza eccessi di componenti ed è soprattutto economico. Fornisce circa 700 cal, corrispondenti al 40% del fabbisogno calorico del bambino e ad oltre il 20% di quello dell'adulto. Possiede anche un'importante azione antinfettiva dovuta alla lattoferrina che chela il ferro a livello intestinale.

La funzione più importante degli zuccheri è quella energetica. Il lattosio regola le funzioni intestinali, favorendo la sintesi di vitamine e le fermentazioni acide e proprio nell'intestino viene scisso in glucosio e galattosio, quest'ultimo indispensabile per la funzionalità del sistema nervoso.

Anche per i lipidi, la funzione principale è quella di produrre energia, lo stato di emulsione in cui si trova il grasso ne facilita la digestione da parte dell'organismo. I fosfolipidi hanno azione ipocolesterolemica.

Per quanto riguarda le proteine, queste hanno un alto valore biologico (circa 90), quello della carne ad esempio è di circa 70, sono infatti presenti amminoacidi essenziali come lisina, metionina e triptofano; in più, la grande quantità di immunoglobuline, specialmente nel colostro, conferiscono al latte un'importante azione immunologica.

Nel latte si trovano tutte le vitamine necessarie per l'organismo, ma non in dosi elevate, ed anche una grande quantità di sali minerali, soprattutto calcio e fosforo, elementi fondamentali per ossa e denti; difetta nella quantità di ferro, ed è proprio per questa carenza che non lo si può definire come un alimento veramente completo (Cappelli P., Vannucchi V., 2000).

### 1.3 Normativa

Allo scopo di tutelare il consumatore, il latte crudo deve rispondere a rigidi parametri sanitari, esistono, quindi sia a livello nazionale che comunitario normative che disciplinano tale settore.

#### **Regolamento (CE) n. 853/2004**

Stabilisce le norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.

Vi sono elencati i requisiti microbiologici che deve possedere il latte crudo "in bottiglia" al momento del confezionamento, controllato con frequenza bimestrale.

I requisiti sono diversi e meno restrittivi di quelli previsti per il latte pastorizzato.

Tenore di germi a 30 °C (per ml)	≤ 100000 (*)
Tenore di cellule somatiche (per ml)	≤ 400000 (**)

(\*) Media geometrica mobile, calcolata su un periodo di due mesi, con almeno due prelievi al mese.

(\*\*) Media geometrica mobile, calcolata su un periodo di tre mesi, con almeno un prelievo al mese, a meno che l'autorità competente non specifichi una metodologia diversa per tenere conto delle variazioni stagionali dei livelli di produzione.

**Tab. 3: limiti fissati dal Regolamento 853/2004**

Inoltre il latte deve essere mantenuto refrigerato a una temperatura non superiore ai 6 °C (Regolamento (CE) n. 853/2004).

### Regolamento (CE) N. 2073/2005

In riferimento al Regolamento 178/2002 e al Regolamento 853/2004, stabilisce i criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, ma non sono citati i criteri di igiene di processo per il latte crudo.

In questa tabella sono indicati i criteri di sicurezza alimentare relativi a *Listeria monocytogenes* in specifiche categorie di prodotti.

Categoria Alimentare	Microrganismo	Piano di campionamento		Limiti	Metodo d'analisi	Fasce a cui si applica il criterio
		N	c			
Alimenti pronti per lattanti e alimenti a fini medici speciali	<i>L. monocytogenes</i>	10	0	Assente in 25 gr.	EN/ISO 11290-1	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/ml	EN/ISO 11290-2	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
		5	0	Assente in 25 gr.	EN/ISO 11290-1	Prima che gli alimenti siano immessi sul mercato
Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/ml	EN/ISO 11290-2	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

**Tab. 4: limiti di accettabilità relativi a *Listeria monocytogenes* previsti dal Regolamento 2073/2005**

Con riferimento al “pacchetto igiene”, le regioni Lombardia e Emilia Romagna, hanno emesso due circolari per disciplinare la vendita diretta al consumatore di latte crudo nell’azienda agricola di produzione o presso gli erogatori automatici.

In esse vengono stabilite: nuove indicazioni sui requisiti del latte crudo; le caratteristiche igienico sanitarie degli allevamenti di produzione e dei distributori automatici, oltre a quelle riguardanti le fasi di mungitura, raccolta e manipolazione del latte; i provvedimenti da adottare in caso di superamento dei limiti previsti; le modalità dei controlli ufficiali e le informazioni ai consumatori. «Il latte appena munto deve essere immediatamente filtrato,

refrigerato (0-4 °C) e conservato in apposito tank o contenitore che garantisca il mantenimento della temperatura e il rimescolamento» (Regolamento (CE) n. 2073/2005).

### Limiti di accettabilità per la regione Lombardia

Parametro	Limite di accettabilità	Frequenza
Tenore in germi a 30 °C (per ml)	Inferiore o uguale a 25000 (media geometrica calcolata su un periodo di due mesi con almeno due prelievi al mese)	Almeno due prelievi al mese
Titolo di cellule somatiche (per ml)	Inferiore o uguale a 300000 (media geometrica calcolata con almeno un prelievo al mese, su un periodo di tre mesi)	Almeno un prelievo al mese
Residui di sostanze inibenti	Non superiori ai limiti fissati negli allegati I e II del Regolamento CEE n. 2377/90	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Assente	
<i>Salmonella</i> spp.	Assente	
<i>Campylobacter</i>	Assente	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Assente	
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	Assente	
<i>E. coli</i> O:157 H:7	Assente	
<i>Staphilococcus aureus</i>	Assente	
<i>Coxiella burnetii</i>	Assente	

Tab. 5: Circolare n. 19, Regione Lombardia, 2007

### Limiti di accettabilità per la regione Emilia Romagna

Ricerca	Valore	Frequenza
Tenore in germi a 30 °C (per ml)	Inferiore o uguale a 50000 (media geometrica calcolata su un periodo di due mesi con almeno due prelievi al mese)	Almeno due prelievi al mese
Titolo di cellule somatiche (per ml)	Inferiore o uguale a 300000 (media geometrica calcolata con almeno un prelievo al mese, su un periodo di tre mesi)	Almeno un prelievo al mese
<i>Staphylococcus aureus</i> (per ml)	n= 5 m= 500 M= 2000 c= 2	Mensile
<i>Listeria monocytogenes</i>	Assenza in 25 g	Mensile
<i>Salmonella</i> spp.	Assenza in 25 g	Mensile
<i>E. coli</i> verocitotossici	Assenza in 25 g	Mensile
Aflatossina M1	≤ 50 ppt	Mensile

Tab. 6: Circolare n. 17, Regione Emilia Romagna

### **Ordinanza ministeriale del 10.12.2008**

I diversi casi di tossinfezione alimentare legati al consumo di latte crudo hanno causato l'intervento del Ministero della Salute che ha emanato una ordinanza che stabilisce misure urgenti in materia di produzione, commercializzazione e vendita diretta di latte crudo per l'alimentazione umana. L'ordinanza prevede che tutti i distributori esponano in rosso l'indicazione chiaramente visibile "prodotto da consumarsi dopo bollitura" e che la data di scadenza non superi i 3 giorni dalla data della messa a disposizione del consumatore; inoltre il responsabile della macchina erogatrice deve escludere la disponibilità di contenitori destinati al consumo in loco del prodotto ed è vietata la somministrazione nella ristorazione collettiva e nelle mense scolastiche (Ordinanza del 10 dicembre 2008).

### **1.4 Listeriosi**

La listeriosi prende il nome dall'agente patogeno che la causa e cioè il batterio *Listeria monocytogenes*. La dose infettiva di questa malattia definibile come tossinfezione alimentare, è piuttosto bassa. Sono, infatti, sufficienti circa 100 cellule batteriche/g per causare infezione. Esistono due forme, quella più tipica diarroica, che si manifesta nel giro di poche ore dall'ingestione, e quella invasiva o sistemica, che attraverso i tessuti intestinali e il flusso sanguigno si diffonde sviluppando forme più acute di sepsi, encefaliti e meningiti (<http://www.epicentro.iss.it>). *Listeria monocytogenes* interessa soprattutto fasce di popolazione a rischio come soggetti immunocompromessi, bambini, anziani e donne in gravidanza. Varie sono le modalità di trasmissione come quella verticale da madre a figlio o quella da animale ad uomo. In realtà sembra che la listeriosi colpisca prevalentemente l'uomo in seguito a consumo di alimenti contaminati (Farber J. M. *et al.*, 1991). Gli alimenti maggiormente implicati quali veicolo di infezione sono stati dimostrati essere: prodotti vegetali, formaggi e soprattutto prodotti ready-to-eat. La listeriosi umana ha una bassa incidenza, ma può dare quadri clinici gravi con elevata letalità (Ramaswamy V. *et al.*, (2007). I dati pubblicati dall'Oms (World Health Organization) sul rischio associato a *Listeria*, dimostrano che l'incidenza annuale della listeriosi umana nel mondo va da 0,1 a 11,3 casi per milioni di abitanti, e da 0,3 a 7,8 casi per milione di persone in Europa (<http://www.who.int>). I dati del FoodNet, il sistema di sorveglianza per le tossinfezioni alimentari statunitense nato nel 1996 e associato ai Cdc (Centers for Disease Control), riporta nel quinquennio 2000 – 2005 i seguenti dati relativi alla listeriosi negli Stati Uniti:

<b>Anno</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>
N.casi	105	94	98	139	119	136
Incidenza su 100.000 abitanti	0,34	0,27	0,26	0,33	0,32	0,30
Incidenza maschi	0,30	0,26	0,28	0,30	0,32	0,31
Incidenza femmine	0,39	0,28	0,23	0,36	0,22	0,30
Mortalità	21%	20%	18%	17%	16%	12%

**Tab. 7: dati Reports 2000-2005 – Stati Uniti**

Secondo i Cdc però, nonostante la notifica obbligatoria della malattia, vengono registrati solitamente soprattutto i casi più acuti, che richiedono ospedalizzazione o attenzione medica, e che sono stimati essere solo il 50 per cento del totale. Nel 2000, i Cdc hanno messo in evidenza nei rapporti FoodNet che la *Listeria* è il patogeno alimentare con più alto tasso di ospedalizzazione (90,5% dei casi) e al secondo posto come mortalità (21%) (<http://www.cdc.gov>) Anche secondo l'Oms, il tasso di mortalità legato all'infezione da *Listeria monocytogenes* è pari al 20-30% degli ospedalizzati. Negli Stati Uniti è stata osservata, nel quinquennio 1989-93, una riduzione dell'incidenza della listeriosi, da 7,9 per milione di abitanti a 4,4 dovuta principalmente alla messa in atto di attente pratiche preventive e alle intense campagne informative avviate verso la fine degli anni '80 sul tema della sicurezza alimentare. L'avvio del FoodNet, e quindi un monitoraggio più accurato ha permesso un'ulteriore riduzione del 40% dal 1996 al 2002. L'Oms, ha registrato un simile trend di riduzione anche in Europa, in Gran Bretagna e in Australia e in Francia. In Italia, la notifica della listeriosi rientra tra quelle con obbligo di denuncia, come previsto per le tossinfezioni alimentari dal decreto ministeriale del 15/12/1990. Nel 2002, negli Stati Uniti, il consumo di carne di tacchino contaminata ha provocato 54 casi di malattia, 8 morti e 3 morti fetali in 9 stati diversi.

In Europa, i prodotti lattierocaseari sembrano essere i responsabili della metà dei casi notificati. Epidemie di questi tipo si sono verificate in Svizzera nel 1983 e nel 1987, a causa di formaggi molli non pastorizzati, nel 1986 in Austria per consumo di latte non pastorizzato. Il consumo di burro contaminato ha provocato casi di listeriosi in Finlandia nel 1998- 99.

Recentemente l'EFSA (European Food Safety Authority) ha pubblicato un programma di sorveglianza coordinato per la ricerca di *Listeria monocytogenes* negli alimenti pronti per il consumo, richiesto dalla Commissione europea. Lo studio verifica oltre che il livello di

contaminazione di questa tipologia di prodotti alimentari negli Stati membri anche i criteri di sicurezza alimentare per questo patogeno (The EFSA Journal, 2009).

Il progetto PulseNet Europa avviato dal Cnr francese nel 2003 in collaborazione con 27 laboratori europei consiste nella sorveglianza microbiologica delle infezioni da *Listeria* in Europa e nella creazione di un database elettronico condiviso sui profili genetici dei ceppi identificati nei diversi paesi e nei diversi cibi. Nelle tabelle seguenti sono riportati i dati relativi alla sorveglianza dei casi di listeriosi sul territorio europeo tra il 1999 e il 2001 riportati da Eurosurveillance (De Valk H. *et al.*, 2005).

**TABLE 1**  
Observed number of cases and incidence of listeriosis, by country, by surveillance system (latest year available), ListerNet

Country	Year	System	Observed cases	Observed incidence* (1 000 000)
Austria	2000	Reference laboratory	14	1.7
Belgium (Flanders)	1999	Statutory notification	26	4.4
Belgium	2000	Sentinel + reference laboratory	48	4.7
Denmark	2000	Syndromic surveillance (meningitis)	6	1.1
	2001	Statutory notification	38	7.2
	2001	Reference laboratory	38	7.2
England and Wales	2001	Universal voluntary reporting and reference laboratory	144	2.7
	2000	Reference laboratory	81	1.5
Finland	2001	Statutory notification	29	5.5
France	2001	Statutory notification+ reference laboratory	187	3.2
	2000	Syndromic surveillance (CNS+blood stream infections)	148	2.5
Germany	2001	Statutory notification	220	2.7
Greece	2001	Universal voluntary reporting	3	0.3
	2001	Syndromic surveillance (meningitis)	2	0.2
Iceland	2001	Statutory notification + NRL	0	0.0
Ireland	2001	Universal voluntary reporting	6	1.6
Italy	1999	Reference laboratory	11	0.2
	1999	Statutory notification	40	0.7
	2001	Syndromic surveillance (meningitis)	31	0.5
Netherlands	2001	Sentinel surveillance	17	1.1
	2000	Syndromic surveillance (meningitis)	26	1.7
Norway	2001	Statutory notification	17	3.8
	2000	Reference laboratory	11	2.5
Portugal		No surveillance		
Scotland	2001	Universal voluntary reporting	15	2.9
Spain	2000	Universal voluntary reporting	35	0.9
	2000	Reference laboratory	60	1.5
Sweden	2001	Statutory notification	67	7.5
	2001	Reference laboratory	12	1.4
Switzerland	2000	Statutory notification	54	7.4
	2000	Reference laboratory	46	6.3

\* The observed incidence reflects both the real incidence and the sensitivity of the surveillance system. Therefore, data cannot be compared between countries without taking into account the differences in sensitivity of these surveillance systems

**Fig. 6: dati Eurosurveillance 1999-2001 – incidenza listeriosi su 1.000.000 di abitanti**  
(<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=572>)

TABLE 2

Reported outbreaks of listeriosis and of *Listeria* gastroenteritis in Europe 1990-2002

Year	Country	Number of cases*	Transmission	Incriminated food	Potential international implication
1992	France	279	foodborne	Pork tongue in jelly (11)	Exported product
1992	Spain	24	foodborne	Unknown	
1992	Norway	6	foodborne	Sliced cold meat	
1993	France	38	foodborne	Rillettes (pork meat) (12)	Exported product
1993	Italy	18 gastroenteritis	foodborne	Rice salad (2)	
1994-95	Sweden	9	foodborne	Gravad trout (13)	
1995	France	36	foodborne	Cheese (raw cows' milk) (14)	
1995	Iceland	5	unidentified	Unidentified	
1996	Denmark	3 gastroenteritis	unidentified	Unidentified (15)	
1997	France	14	foodborne	Cheese (raw cows' milk)	Exported product
1997	Finland	5	foodborne	Cold-smoked rainbow trout (16)	
1997	Italy	1566 gastroenteritis	foodborne	Corn salad (17)	
1998-99	Finland	25	foodborne	Butter (18)	
1999	England and Wales	2	foodborne	Cheese/cheese salad/ sandwiches (19)	
1999	France	3	foodborne	Cheese (raw cow's milk)	Possible cases in Germany?
1999	France	10	foodborne	Rillettes (processed pork meat) (20)	Exported product
1999-00	Finland	10	foodborne	Vacuum-packed fish products (21)	Exported?
2000	France	32	foodborne	Pork tongue in jelly (20)	Exported ?
2000	Portugal	1	foodborne	Cheese	
2000	Spain	15	foodborne	Undetermined	
2001	Belgium	1 + 2 gastroenteritis	foodborne	Ice cream cake	Invasive illness of Belgian case diagnosed in France
2002	France	11	foodborne	Spreadable raw sausage (22)	Export to Germany, Belgium and Luxembourg

\* Cases refer to invasive listeriosis unless otherwise specified

Fig. 7: dati Eurosurveillance sulle tipologie alimentari associate ai casi di listeriosi

(<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=572>)

Si può osservare come i maggiori responsabili di questi casi di tossinfezione possano ritenersi i prodotti lattierocaseri.

In Italia, nel maggio 1997, il consumo di insalata di mais e tonno contaminato, utilizzato nelle insalate, ha causato un'infezione da *Listeria monocytogenes* in oltre 1500 persone. Nella maggior parte dei casi, si trattava di bambini e del personale di due scuole elementari di Torino, mentre altri casi si sono avuti tra gli studenti dell'Università della stessa città (<http://www.epicentro.iss.it>).

I dati riportati dal Ministero della Salute evidenziano un aumento progressivo dei casi di listeriosi in Italia tra il 2000 e il 2008, come si può osservare dalla tabella sottostante (<http://www.ministerosalute.it>). La stessa osservazione può essere registrata relativamente alle regioni Lombardia ed Emilia Romagna, territorio oggetto di questa indagine.

N. casi di listeriosi	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Totale Italia	33	38	41	48	32	59	59	89	102
Lombardia	10	15	11	13	9	18	23	40	43
Emilia Romagna	2	3	5	1	2	3	9	11	43

Tab. 8: casi di listeriosi in Italia tra il 2000 e il 2008

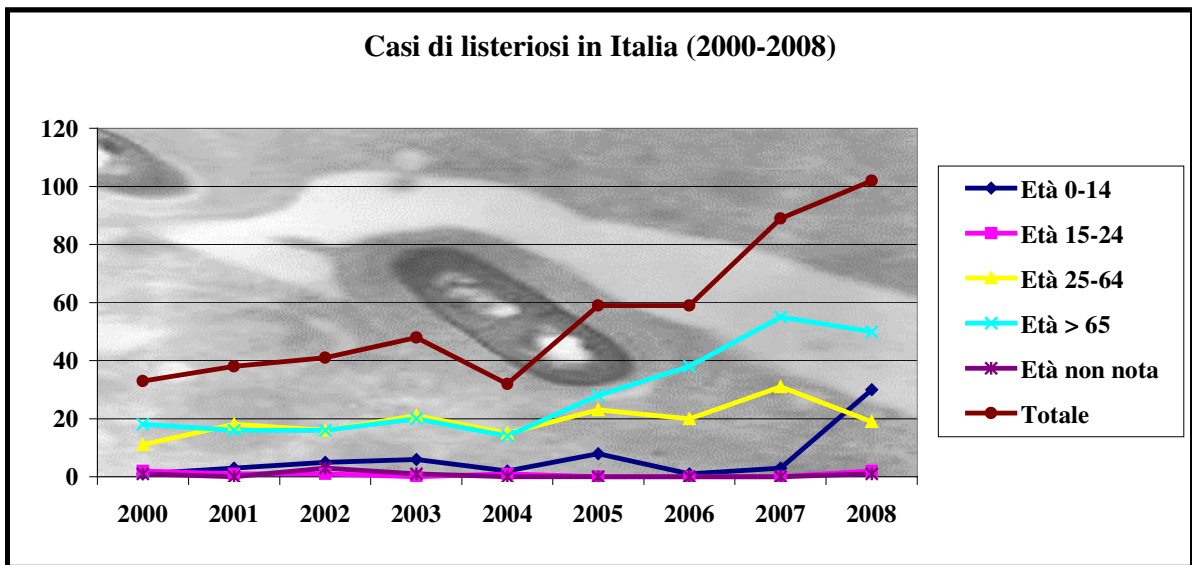


Grafico 1: dati epidemiologici *Listeria monocytogenes* (Italia, 2000-2008)

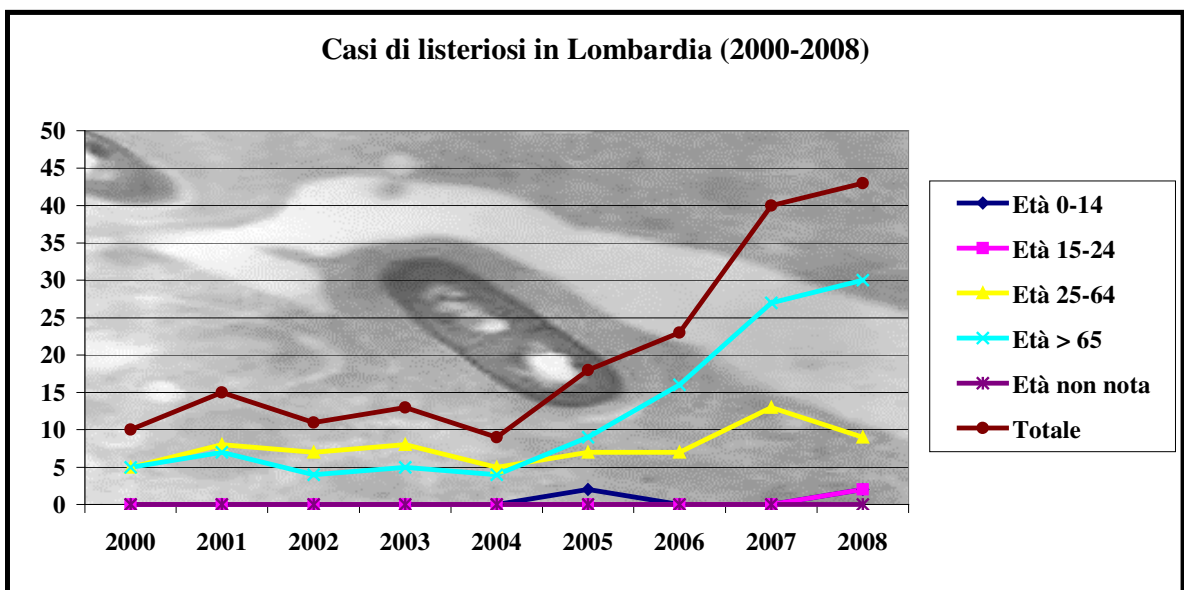
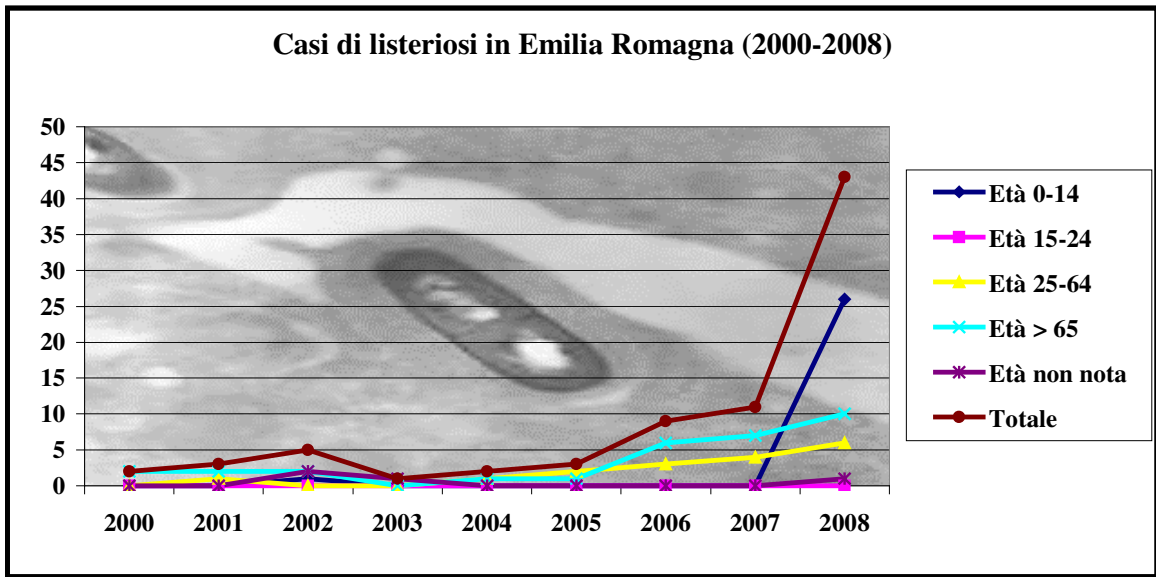


Grafico 2: dati epidemiologici *Listeria monocytogenes* (Lombardia, 2000-2008)



**Grafico 3: dati epidemiologici *Listeria monocytogenes* (Emilia Romagna, 2000-2008)**

Come si pu  osservare dai grafici riportati l'incidenza maggiore dei casi di Listeriosi in Italia e nelle regioni selezionate si ha nei soggetti che hanno un'et  superiore ai 65 anni. Solo nel 2008 in Emilia Romagna il numero maggiore di casi si evidenzia nella fascia di et  compresa fra 0 e 14 anni.

### **1.5 *Listeria monocytogenes***

#### **Caratteristiche morfologiche**

Il batterio *Listeria monocytogenes* appartiene alla famiglia delle *Listeriaceae*, ubiquitarie nell'ambiente, isolate da terreno, materiale vegetale, feci, acque reflue, insilati, stabilimenti, carni, formaggi, prodotti ittici, portatori sani umani ed animali (Hain T. *et al.*, 2007).

Troviamo sette specie diverse tra cui *Listeria ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. murray*, *L. gray*, *L. innocua* e *L. welshimeri*.

Di queste solo due sono patogene: per l'uomo *L. monocytogenes* e per gli animali *L. ivanovii*. Al genere *Listeria* appartengono microrganismi di forma bastoncellare, Gram positivi, asporigeni, aerobi. Possiedono grazie alla presenza di pochi flagelli peritrichi una certa mobilit . Si sviluppa in un ampio intervallo di temperatura tra 0 - 45 C,  , infatti, un microrganismo psicrofilo, ma mantiene la sua vitalit  anche a temperature di pastorizzazione. L'optimum di crescita   rappresentato da circa 37 C (La Placa, 2000). Resiste a concentrazioni saline elevate (concentrazione di NaCl del 10%), cresce a valori di pH compresi tra 4,4 e 9,0 ma la crescita viene inibita a pH inferiori a 5,6 (Liu D., 2006). Produce

acido ma non gas in presenza di carboidrati. *Listeria monocytogenes* è catalasi positiva e ossidasi negativa.

Da test di laboratorio si osserva anche che è in grado di idrolizzare la bile esculina e ha una caratteristica  $\beta$ -emolitica, amplificata dalla presenza di *Staphylococcus aureus*.

Relativamente alle reazioni con gli zuccheri *L. monocytogenes* non fermenta lo xilosio mentre fermenta il ramnosio. Non idrolizza urea, non produce H<sub>2</sub>S e non produce indolo (Galli V. A., 2005).



**Fig. 8:** *Listeria monocytogenes*  
(<http://nrc-cnrc.gc.ca>)

### **Fattori di virulenza**

*L. monocytogenes*, come tutti i patogeni intracellulari, è in grado di perturbare le diverse funzioni delle cellule eucariotiche ospiti, per far sì che possa avvenire il proprio ciclo replicativo. Dopo l'iniziale invasione della cellula, avviene la replicazione all'interno del citoplasma e successivamente il passaggio alle cellule adiacenti.

L'invasione può avvenire per fagocitosi riuscendo a penetrare nei macrofagi e in altre cellule bianche del sangue. Il batterio persistendo nel loro interno, migra nell'organismo insieme ad essi. Nel caso l'attacco avvenga a cellule non fagocitarie, le sostanze che intervengono sono le internaline A e B, polipeptidi che interagiscono con i recettori delle cellule ospiti (Southwick F. S. *et al.*, 1996).

Nella fatispecie InlA ha come recettore E-caderina, proteina di membrana utile nell'adesione intracellulare. Per quanto riguarda InlB innesca un meccanismo di invasione mediato da fattori di crescita. A seguito di queste interazioni si ha il rimodellamento e il riarrangiamento dell'actina. In questo modo *L. monocytogenes* riesce a penetrare nella cellula. Questa, infatti, ingloba il batterio avvolgendolo in una vescicola per poi cercare di distruggerlo.

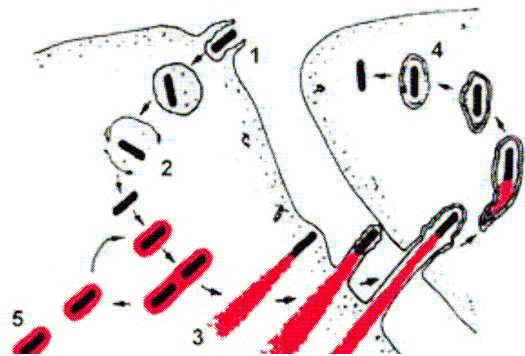
Per evitare l'esposizione ai composti litici, esce dal vacuolo entrando nel citoplasma, mediante la presenza di listeriolisina O (LLO) codificata dal gene *hly*. Mutanti privi di listeriolisina-O non sono virulenti. LLO si attiva con l'acidificazione del fagosoma, e una volta avvenuta la rottura di quest'ultimo, LLO viene inattivato dal pH neutro del citoplasma bloccandone la maturazione. La dissoluzione del vacuolo è possibile grazie alla fosfolipasi C prodotta dai geni *plcB* e *plcA* di *L. monocytogenes* (Vázquez-Boland J. A. *et al.*, 2001).

Una volta raggiunto il citoplasma può proliferare e inizia quindi a moltiplicarsi rapidamente. Grazie alla proteina ActA ciascun microrganismo "si copre" di filamenti di actina, che trova nel citoplasma cellulare. L'actina è una proteina contrattile e grazie a queste contrazioni *L. monocytogenes* preme contro la membrana della cellula ospite (Dussurget O. *et al.*, 2004).

La membrana della cellula si estroflette e invagina la membrana della cellula adiacente e riesce a penetrare quindi nel citoplasma di quest'ultima.

Il batterio si trova quindi all'interno di un nuovo vacuolo e il ciclo replicativo riprende.

Grazie a questa specifica strategia, *L. monocytogenes* può diffondersi nell'organismo passando da una cellula all'altra senza venire in contatto con i liquidi organici e quindi sfuggendo alle difese anticorpali dell'ospite (Scott E. Martin *et al.*, 2000).



**Fig. 9: meccanismo patogenetico di *Listeria monocytogenes***  
(<http://www.scienceblogs.com>)

Sono stati individuati 12 sierotipi di *Listeria monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 7. Attraverso le metodiche di ribotipizzazione e sub tipizzazione i ceppi di *L. monocytogenes* sono stati suddivisi in tre linee genetiche diverse, in base ai diversi alleli dei geni di virulenza (*hly*, *actA* e *inlA*), ai quali sono stati associati rispettivamente 8, 11, e 2 alleli (Wiedmann M. *et al.*, 1997):

Linea I: 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e, 7

Linea II: 1/2a, 1/2c, 3a, 3c

Linea III: 4a, 4c

Una ricerca svolta alla Cornell University ha dimostrato che i ceppi di *L. monocytogenes* isolati da alimenti e da campioni clinici appartengono a linee genetiche distinte ma sovrapposte: i ceppi umani sono riconducibili più frequentemente alla linea I, mentre quelli isolati da alimenti alla linea II. Inoltre è stato verificato che i ceppi isolati da alimenti presentano alcuni ribotipi con affinità specifiche per alcune tipologie alimentari (Gray M. J. *et al.*, 2004).

### **Sintomatologia nell'uomo**

Negli adulti la patologia si manifesta in seguito al consumo di alimenti contaminati; mentre la listeriosi neonatale può verificarsi per passaggio transplacentale del microrganismo, nei casi di sepsi della madre o per colonizzazione delle vie genitali con conseguente infezione del feto durante il parto. Dopo un'incubazione di 3-8 giorni la malattia si manifesta con febbre, cefalea, ascessi localizzati interni ed esterni, endocardite, lesioni cutanee, lesioni granulomatose del fegato e di altri organi (Mims C. *et al.*, 2006). La listeriosi nei soggetti immunocompetenti è quasi sempre limitata a forme gastroenteriche con nausea, vomito, diarrea e febbre, qualche ora dopo l'ingestione di alimenti contaminati, normalmente senza complicanze neurologiche. Durante la gravidanza le donne colpite da listeriosi presentano febbre, diarrea, dolori muscolari, infiammazione delle meningi, aborto o parto prematuro. I neonati che sopravvivono all'infezione possono manifestare meningite tardiva dopo la 1a settimana di vita e normalmente entro il 1° mese, infiammazione dell'encefalo, sepsi e morte. Gli antibiotici più attivi sembrano essere ampicillina e gentamicina; gli insuccessi clinici non indicano necessariamente il fallimento della terapia, poiché in molti casi la terapia viene iniziata tardivamente proprio per la difficoltà di porre una corretta diagnosi (Doganay M., 2003).

## 2. Materiali e metodi

La ricerca di *Listeria monocytogenes*, sia nel latte crudo tal quale sia sull'inoculato, è stata effettuata su 26 campioni di latte (L<sub>1</sub>- L<sub>26</sub>), provenienti da 3 distributori differenti dislocati sul territorio emiliano (D1, D3) e sul territorio lombardo (D2). Al primo, al terzo e all'ottavo giorno di conservazione, è stata valutata la presenza del microrganismo, mediante l'utilizzo di due differenti metodiche: conta diretta (NORMA UNI EN ISO 11290-1 e 2:2005), su terreno cromogeno ALOA (Biolife) e metodo MPN.

E' stata, inoltre, saggiata la capacità di rilevazione delle due metodiche a confronto, relativamente al microrganismo in oggetto, attraverso l'utilizzo di un protocollo sperimentale sugli stessi campioni di latte crudo, inoculati con un carico microbico predefinito di *Listeria monocytogenes*. Parallelamente sono stati determinati carico mesofilo (NORMA ISO 4833:2004) e valore di pH al 1°, 3° e 8° giorno di conservazione dei campioni di latte crudo tal quale.

### 2.1 Ricerca di *Listeria monocytogenes* in latte crudo

#### Conta diretta

Nei giorni previsti sono stati prelevati 25 ml di campione e omogeneizzati con 225 ml di Fraser Broth Base (Biolife) (brodo di arricchimento con proteoso peptone, triptone, estratto di carne e lievito, sodio cloruro, sodio fosfato monoacido, potassio fosfato biacido, esculina e litio cloruro, supplementato con ferro d'ammonio citrato) per 2 minuti in Stomacher. Successivamente sono state allestite diluizioni scalari in base dieci sino a 10<sup>-6</sup> in FB. Le diluizioni, previo periodo di riposo di un ora a temperatura ambiente, sono state seminate in quantità di 0,1 ml, per spatolamento, in doppio su terreno ALOA e incubate a 37 °C per 24 ore. Agar *Listeria* Ottaviani & Agosti (ALOA) è un terreno selettivo, cromogenico e differenziale. L'azione selettiva è riconducibile alla presenza nel terreno di base del litio cloruro ed all'aggiunta della miscela antimicrobica del supplemento selettivo contenente ceftazidime, polimixina B, acido nalidissico e cicloeximide. L'azione differenziale è dovuta alla presenza nel terreno del composto cromogenico Xglucoside quale substrato per l'evidenziazione dell'enzima β-glucosidasi, comune a tutte le specie di *Listeria*.

L'azione differenziale specifica è ottenuta con un substrato specifico per la fosfolipasi C, propria della sola specie *L. monocytogenes* e di alcuni ceppi di *L. ivanovii*.

Successivamente alle 24 ore di incubazione, è stata eseguita la lettura delle piastre; in caso di crescita microbica è stato determinato il carico secondo la seguente formula:

$$N = \sum / V ( n_1 + 0,1 \cdot n_2 ) \cdot d$$

$\sum$  = sommatoria delle colonie\* contate nelle piastre delle due diluizioni successive

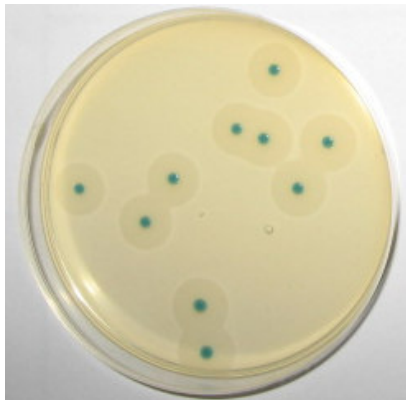
V = volume dell'inoculo (0,1 ml)

$n_1, n_2$  = rispettivamente numero delle piastre considerate alla prima e seconda diluizione

d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata

\*il numero delle colonie leggibili si attestano dalle 20 alle 80 colonie, e non superiori a 200.

Le colonie tipiche di *Listeria monocytogenes* (verdi-blu cerchiato da alone opaco) e le colonie atipiche (verdi senza alone o con alone translucido) sono state selezionate e seminate su TSA+ (OXOID) per i test di conferma.



**Fig. 10: Agar Listeria Ottaviani & Agosti (ALOA)**

### **Metodo MPN**

Il metodo Most Probable Number è una procedura utilizzata per stimare la densità di una popolazione di microrganismi vitali in un dato campione tramite una serie di diluizioni seriali. Ad ogni tempo di controllo sono stati prelevati 10 ml di campione e diluiti con 90 ml di Broth Peptone Water (OXOID) e successivamente omogeneizzati in Stomacher. Il BPW è un brodo di arricchimento composto da: peptone, sodio cloruro, sodio fosfato monoacido e potassio fosfato monoacido. Successivamente 1 ml di soluzione è stata trasferita in una provetta

contenente 9 ml di BPW allestendo diluizioni seriali in altre provette uguali fino alla diluizione  $10^{-3}$ . In seguito da ognuna delle tre diluizioni è stato prelevato 1 ml e trasferito in 9 ml di FB. Questa operazione è stata effettuata in triplo per tutte le diluizioni ed ogni provetta così ottenuta è stata incubata per 48 ore a 37 °C.

Se presente *Listeria* spp., l'esculina idrolizzata, reagisce con il citrato di ammonio ferrico e provoca l'imbrunimento delle brodocolture. Al termine dell'incubazione ogni provetta imbrunita è stata seminata in duplice su terreno Oxford e ulteriormente incubata per 48 ore a 37 °C.

Il terreno *Listeria* Oxford Agar Base (OXOID) è un terreno di base che contiene agenti inibitori quali litio cloruro, acriflavina, cefotetan e fosfomicina. e inoltre ferro ammonio citrato ed esculina come indicatori. *Listeria monocytogenes* idrolizza l'esculina e si presenta dopo 48 h di incubazione come colonie grigio-marroni con alone marrone.

Trascorso il periodo di incubazione, sono state prelevate le colonie tipiche e seminate su TSA+ per i test di conferma.



**Fig. 11: *Listeria* Oxford Agar Base (OXFORD)**

### **Test di conferma**

Le colonie cresciute sui terreni ALOA e Oxford sono state selezionate e seminate su terreno Triptone Soya Agar supplementato con estratto di lievito e incubate per 24 ore a 37°C.

TSA+ è un terreno generico per la crescita di una grande varietà di microrganismi sia aerobi che anaerobi, composto da triptone, trifeniltetrazoliocloruro, peptone di soia, agar, sodio cloruro e supplementato con estratto di lievito. La crescita culturale è stata, poi, sottoposta a test di conferma al fine di accertare la reale presenza di *Listeria monocytogenes* e l'eventuale presenza di *Listeria* spp. o altre specie competitive.

- **Colorazione di Gram:** questa analisi sfrutta la diversa capacità delle pareti cellulari dei microrganismi a trattenere determinate sostanze coloranti: i batteri che alla fine dell'analisi presenteranno colorazione viola sono classificati come Gram positivi, mentre quelli che assumono colorazione rossa sono definiti Gram negativi. Il metodo prevede il prelievo, mediante ansa sterile, di una porzione della colonia in esame e l'applicazione della patina batterica su un vetrino portaoggetti fissato con breve applicazione di calore. Si procede poi alla colorazione del vetrino con soluzione Cristal violetto per due minuti; eliminato l'eccesso di colorante si applica soluzione di Lugol (soluzione di iodio, ioduro di potassio e acqua) per un tempo variabile dai 3 ai 5 minuti, al termine si decolora per circa 10 secondi con alcool etilico/acetone 1:1. Dopo un rapido lavaggio con acqua di fonte, vengono applicate per 30-60 secondi alcune gocce di fucsina al fine di ottenere colorazione di contrasto. Il vetrino, nuovamente lavato e asciugato, sarà così pronto per essere osservato al microscopio con obiettivo ad immersione.

L'analisi al microscopio unita alla colorazione di Gram consente di evidenziare la presenza di Gram negativi o Gram positivi e al tempo stesso di fare una valutazione della morfologia dei microrganismi in esame.

- **Test della catalasi:** questo test consente di determinare la presenza dell'enzima catalasi, posseduto da alcuni batteri detti "catalasi positivi". Il metodo consiste nel prelevare una colonia presa in esame e nel sospenderla in una goccia di perossido di idrogeno al 3% posta su di un vetrino. Lo sviluppo di effervescenza superficiale, dovuta allo sviluppo di ossigeno, indica positività alla prova.

- **Test Emolisi:** questo test verifica la capacità del microrganismo di causare l'emolisi, cioè la distruzione degli eritrociti e dell'emoglobina. Per effettuare questa prova si utilizza la tecnica Camp Test, mediante l'impiego di piastre di agar sangue, si procede eseguendo uno striscio con infissione del ceppo in esame, perpendicolarmente viene poi effettuato un secondo striscio di ceppi ATCC di *Staphylococcus aureus* e *Rhodococcus equi*. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C, si esaminano le piastre alla ricerca di reazioni emolitiche nelle vicinanze dei punti di infissione (aloni translucidi). L'emolisi di *Listeria monocytogenes* risulta maggiore nelle vicinanze dello striscio di *S. aureus*.

- **Test biochimico-enzimatico:** Api Listeria (bioMerieux) è un sistema standardizzato per l'identificazione delle varie specie di listeria. Ogni confezione contiene una fiala di API Suspension Medium da 2 ml, nella quale deve essere stemperata una concentrazione pari a 1

Mc Farland delle colonie prese in esame. La soluzione viene poi inserita in una galleria API composta da 10 microprovette contenenti substrati disidratati, per la ricerca delle attività enzimatiche e fermentative degli zuccheri. Le reazioni prodotte durante l'incubazione della galleria per 24 ore a 37 °C, si traducono in viraggi cromatici spontanei o rilevati tramite l'aggiunta di reattivi ausiliari (ZYM B) nella microprovetta DIM. Ai fini dell'analisi dei dati ad ogni sequenza cromatica della galleria è associato un codice numerico corrispondente a diverse specie di listeria.

TEST	COMPONENTI ATTIVI	Quantità ( mg /cup.)	REAZIONI	RISULTATI	
				NEGATIVO	POSITIVO
DIM	Substrati enzimatici	0,106	Differenziazione <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	ZIM B /3 min	
				Arancione Chiaro Rosa-beige Grigio-beige	Arancione
ESC	Esculina	0.16	Idrolisi Esculina	Giallo chiaro	Nero
	Citrato di Ferro	0.024			
$\alpha$ MAN	4-nitrofenil- $\alpha$ D-mannopiroside	0.045	$\alpha$ -mannosidasi	Incolore	Giallo
DARL	D-Arabitolo	0.4	Acidificazione	Rosso/ rosso arancione	Giallo/ giallo arancione
XYL	D-xilosio	0.4	acidificazione		
RHA	L-Rammosio	0.4	acidificazione		
MDG	Metil- $\alpha$ D-Glucopiranoside	0.4	acidificazione		
RIB	D-ribosio	0.4	acidificazione		

**Tab. 9: Componenti del test API Listeria**

## 2.2 Protocollo sperimentale

Durante l'esecuzione del protocollo sperimentale è stato effettuato l'inoculo di un carico prestabilito di *Listeria monocytogenes* in 200 ml di latte crudo, prelevato dal campione impiegato per la ricerca del patogeno nel latte tal quale. Il progetto è stato articolato in due fasi principali: standardizzazione dell'inoculo e inoculo. Successivamente, la ricerca di *Listeria monocytogenes* e i test d'identificazione sono state eseguite mediante le metodiche sopra citate e utilizzate anche per il campione tal quale.

### Standardizzazione inoculo.

E' stata effettuata la semina su TSA+ di un ceppo di *Listeria monocytogenes*, ATCC 10115 (Biogenetics). Il terreno è stato poi incubato per 24 ore a 37 °C al fine di rivitalizzare e permettere la moltiplicazione del microrganismo. Sono state prelevate tre colonie isolate di *Listeria monocytogenes* e stemperate in 10 ml di FB. Successivamente sono state allestite diluizioni scalari fino a 10<sup>-9</sup>. Ogni diluizione è stata poi seminata per spatolamento in doppio su terreno cromogeno ALOA e termostata a 37 °C per 24 ore, trascorse le quali è stato effettuato il calcolo del carico di *Listeria monocytogenes* corrispondente ad ogni diluizione. Il carico è stato calcolato tramite la seguente formula:

$$N = \sum / V ( n_1 + 0,1 \cdot n_2 ) \cdot d$$

### Inoculo

E' stato poi determinato il volume dell'inoculo, che viene così calcolato:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2, \text{ dove:}$$

C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub> sono rispettivamente concentrazione iniziale e finale

V<sub>1</sub> e V<sub>2</sub> sono rispettivamente volume iniziale (inoculo) e volume finale.

Per ogni campionamento è stata inoculata in 200 ml di latte crudo, una concentrazione di *Listeria monocytogenes* prestabilita in fase di standardizzazione. Il campione è stato poi suddiviso in 3 aliquote di 50 ml ciascuno, corrispondenti al 1°, 2° e 3° giorno di shelf life, e conservato a temperature di circa 4°C in frigorifero.

## 2.3 Carico microbico mesofilo

Sul latte crudo tal quale è stato determinato il carico microbico mesofilo come previsto dal Regolamento (CE) 853/2004 e alle circolari 19 della regione Lombardia e 17 della regione

Emilia Romagna (NORMA ISO 4833:2004). Il metodo è stato eseguito tramite l'aggiunta di 25 ml di latte crudo, direttamente prelevato dal litro-campione, con 225 ml di soluzione di Ringer (OXOID). La soluzione di Ringer, che funge da diluente isotonic per le cellule batteriche, viene preparata sciogliendo una compressa composta da sodio cloruro, potassio cloruro, cloruro di calcio anidro e carbonato di sodio acido in 500 ml di acqua distillata e successivamente sterilizzata in autoclave. Previa omogeneizzazione in Stomacher del campione, sono state allestite le diluizioni seriali, seminate successivamente in doppio per spatolamento su Plate Count Agar (OXOID). PCA è un terreno standard per il conteggio dei microrganismi vitali nell'acqua, nel latte, negli alimenti e prodotti caseari; è un terreno di arricchimento, contiene infatti sostanze nutritive di base necessarie per lo sviluppo e la riproduzione dei microrganismi, presenti nel campione quali triptone, estratto di lievito, glucosio e agar. Trascorso un periodo di incubazione a 30 °C per 72 ore, è stato determinato il carico microbico espresso in ufc/ml mediante la formula :

$$N = \sum / V ( n_1 + 0,1 \cdot n_2 ) \cdot d$$

#### **2.4 Determinazione del pH**

Il valore di pH, corrispondente al 1°, 3° e 8° giorno di conservazione del campione, è stato misurato mediante pH-metro ad una temperatura di 20 °C.

### 3. Risultati

#### 3.1 Ricerca di *Listeria monocytogenes* in latte crudo, mediante conta diretta

La tabella sottostante riporta i dati relativi all'isolamento di *L. monocytogenes*, *Listeria* spp. e di altre listeriacce in tutti i campioni di latte crudo prelevati nei diversi distributori monitorati. Si può subito osservare che, in un solo campione (L7D3), è stata rilevata la presenza di *L. monocytogenes* al terzo giorno di conservazione (T48). Mentre nel campione L2D1 sono state isolate contemporaneamente *L. grayi* e *L. ivanovii* all'ottavo giorno di conservazione (T168).

Campione	T0	T48	T168	Identificazione API
L1D2	-	-	-	
L2D1	+	+	+	<i>L. spp.</i> , <i>L. grayi</i> e <i>ivanovii</i> (T168)
L3D2	+	-	+	<i>L. spp.</i>
L4D1	-	-	-	
L5D2	-	-	-	
L6D2	-	-	+	<i>L. spp.</i>
L7D3	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T48) <i>L. spp.</i>
L8D2	+	-	-	<i>Listeria</i> spp.
L9D3	+	+	+	<i>Listeria</i> spp.
L10D3	-	+	+	<i>Listeria</i> spp.
L11D2	+	+	-	<i>Listeria</i> spp.
L12D2	+	+	+	<i>Listeria</i> spp.
L13D2	-	+	+	<i>Listeria</i> spp.
L14D2	-	-	-	
L15D2	-	-	-	
L16D3	-	-	-	
L17D3	-	-	-	
L18D3	-	-	-	
L19D3	-	-	-	
L20D3	-	-	-	
L21D3	+	+	-	<i>Listeria</i> spp.
L22D3	+	-	-	<i>Listeria</i> spp.
L23D3	-	-	-	
L24D3	-	-	-	
L25D3	-	-	-	
L26D3	-	-	+	<i>Listeria</i> spp.

Tab. 10: sintesi dei dati sull'isolamento di *Listeria* mediante conta diretta

Come si può rilevare dal grafico sottostante *Listeria* spp. è stata isolata nel 42,30% dei campioni. Il campione L2D1 (3,85%) ha mostrato la contemporanea presenza di *L. spp.*, *L.*

*grayi* e *ivanovii* mentre il campione L7D3 (3,85%) di *L. spp.* e *L. monocytogenes*. Il 50% dei campioni è risultato negativo alla ricerca di *Listeria*.

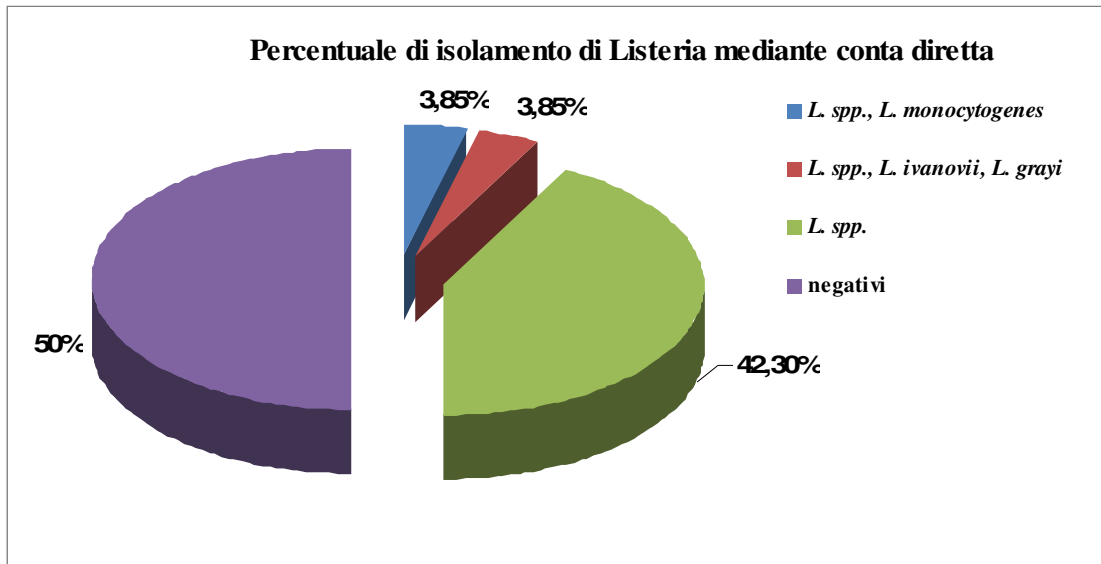


Grafico 4: isolamento di *Listeria* su latte crudo (conta diretta)

Come si può notare nel grafico sottostante la percentuale di rilevamento maggiore si è verificata al T0 e al T168 con una percentuale pari all'11,54%.

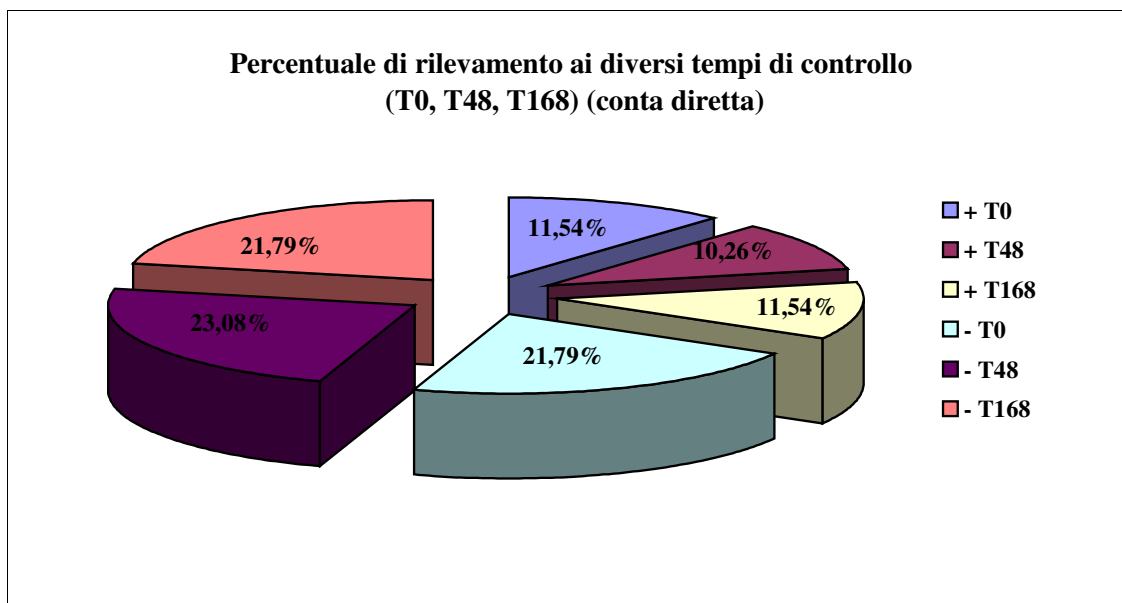


Grafico 5: rilevamento ai tempi T0, T48, T168

### 3.2 Ricerca di *Listeria monocytogenes* in latte crudo, con metodo MPN

Come riassunto nella Tab. 11 la ricerca di *Listeria* con metodo MPN nei campioni di latte crudo tal quale ha consentito di rilevare la presenza di *L. monocytogenes* in un solo campione (L7D3) al terzo giorno di conservazione (T48). Questo conferma il dato ottenuto nell'analisi eseguita mediante conta diretta. Viene inoltre confermata la presenza di *L. ivanovii* all'ottavo giorno di conservazione (T168) nel campione L2D1. Al T168 del campione L3D2 è stata isolata *L. grayi*.

Campione	T0	T48	T168	Identificazione API
L1D2	-	-	-	
L2D1	-	-	+	<i>L. ivanovii</i> (T168)
L3D2	-	-	+	<i>L. grayi</i> (T168)
L4D1	-	-	-	
L5D2	-	-	-	
L6D2	-	-	-	
L7D3	-	+	-	<i>L. monocytogenes</i> (T48)
L8D2	-	-	-	
L9D3	-	-	-	
L10D3	-	-	-	
L11D2	-	-	-	
L12D2	-	-	-	
L13D2	-	-	-	
L14D2	-	-	-	
L15D2	-	-	-	
L16D3	-	-	-	
L17D3	-	-	-	
L18D3	-	-	-	
L19D3	-	-	-	
L20D3	-	-	-	
L21D3	-	-	-	
L22D3	-	-	-	
L23D3	-	-	-	
L24D3	-	-	-	
L25D3	-	-	-	
L26D3	-	-	-	

Tab. 11: sintesi dei dati sull'isolamento di *Listeria* con metodo MPN

Come mostra il grafico sottostante, la tecnica MPN ha permesso di rilevare sia *L. monocytogenes* che *L. ivanovii* e *L. grayi* con una percentuale del 3,85%. I campioni negativi sono risultati essere l'88,45%.

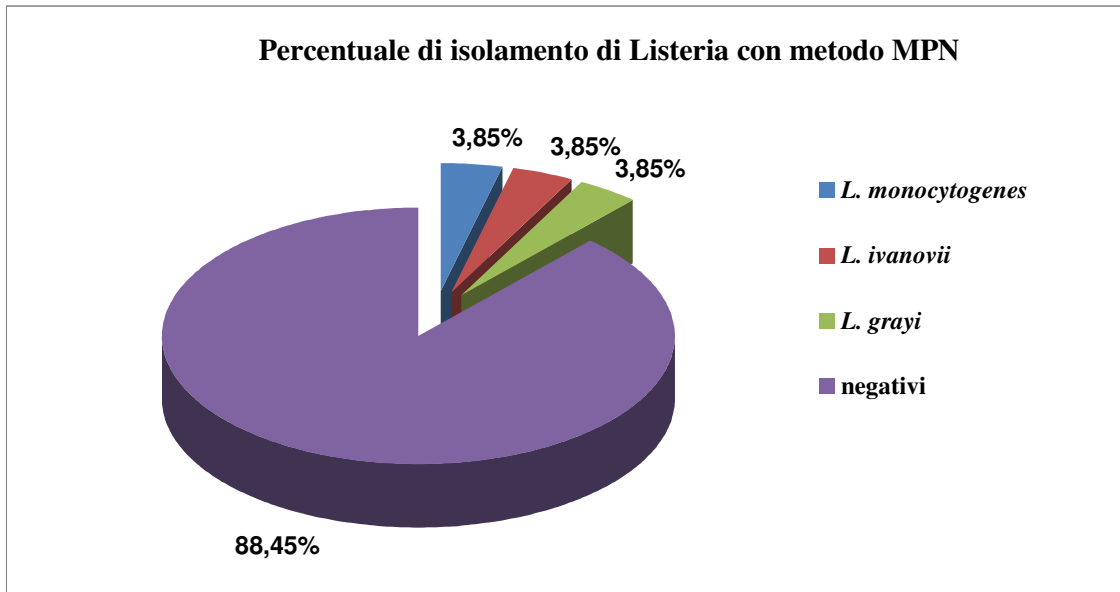


Grafico 6: isolamento di Listeria su latte crudo (metodo MPN)

Il grafico sottostante permette di evidenziare che al T0 non è stato possibile effettuare nessuna identificazione. La percentuale di rilevamento maggiore è pari al 2,56% e corrisponde al T168. Mentre al T48 è stata rilevata una percentuale pari all' 1,28%.

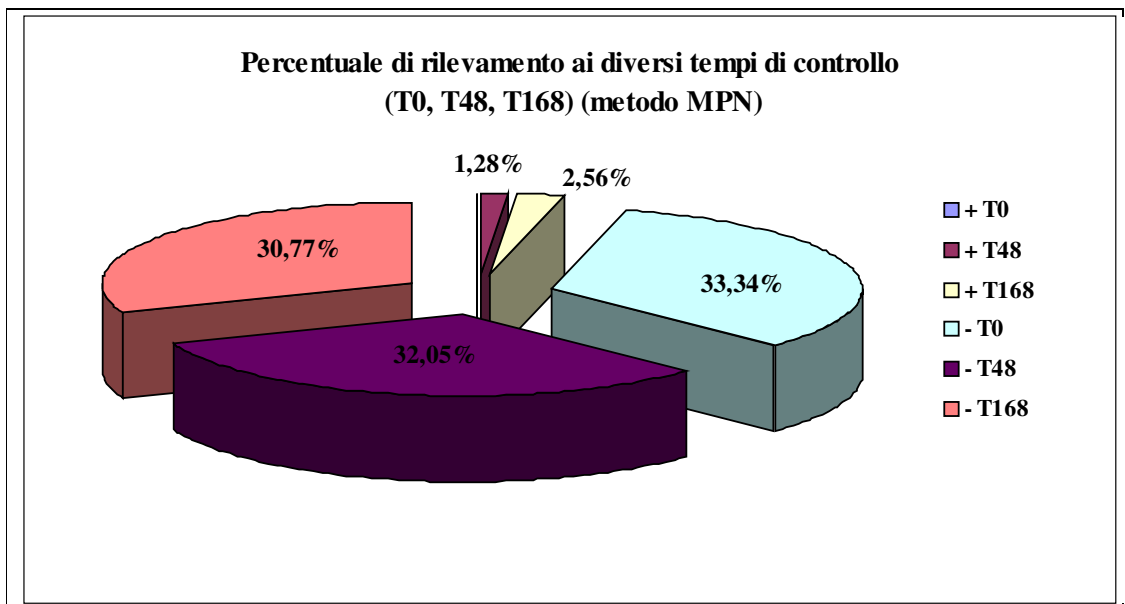


Grafico 7: rilevamento ai tempi T0, T48, T168

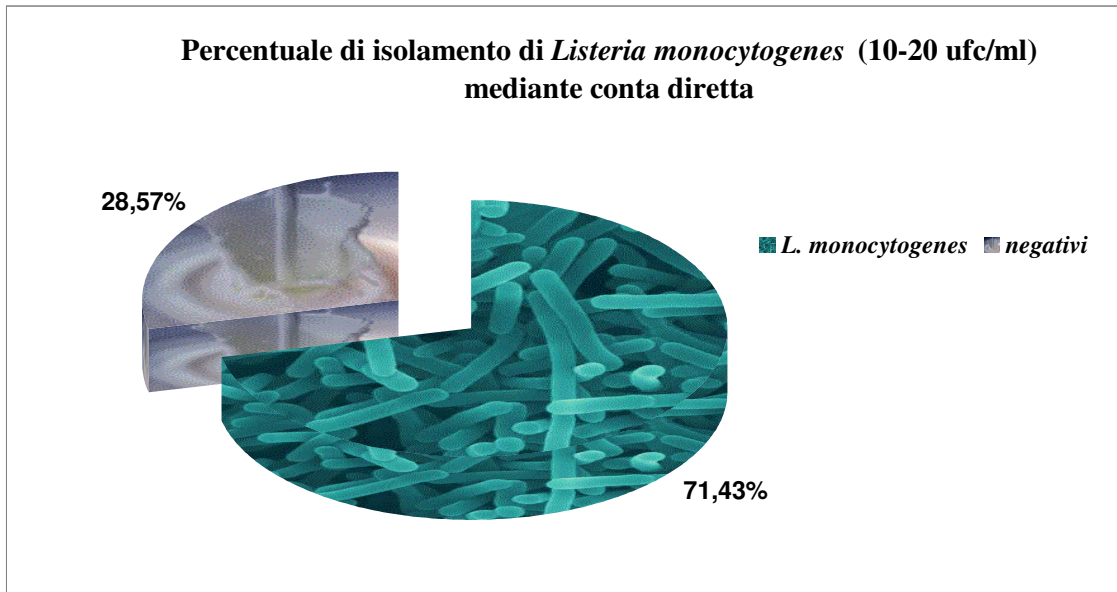
### 3.3 Ricerca di *Listeria monocytogenes* in latte crudo inoculato, mediante conta diretta

#### - Contaminazioni pari a 10-20 ufc/ml

Come si può notare dalla tabella 12 in 7 campioni inoculati con carico pari a 10-20 ufc/ml la presenza di *L. monocytogenes* è stata rilevata cinque volte (71,43%). Più precisamente con valori di inoculo pari a 10 ufc/ml, in 3 campioni su 5 (L6D2, L14D2, L15D2), la tecnica ha permesso di isolare il microrganismo. Mentre, quando l'inoculo iniziale è risultato essere di 20 ufc/ml (L11D2, L13D2), la rilevazione di *L. monocytogenes* è stata possibile in entrambi i casi. Inoltre si può notare che nel campione L15D2 è stata rilevata la presenza di *L. ivanovii* al terzo giorno di conservazione con un carico pari a 150 ufc/ml (2,17 Log ufc/ml). Nello stesso campione non contaminato artificialmente *L. ivanovii* non era stata isolata.

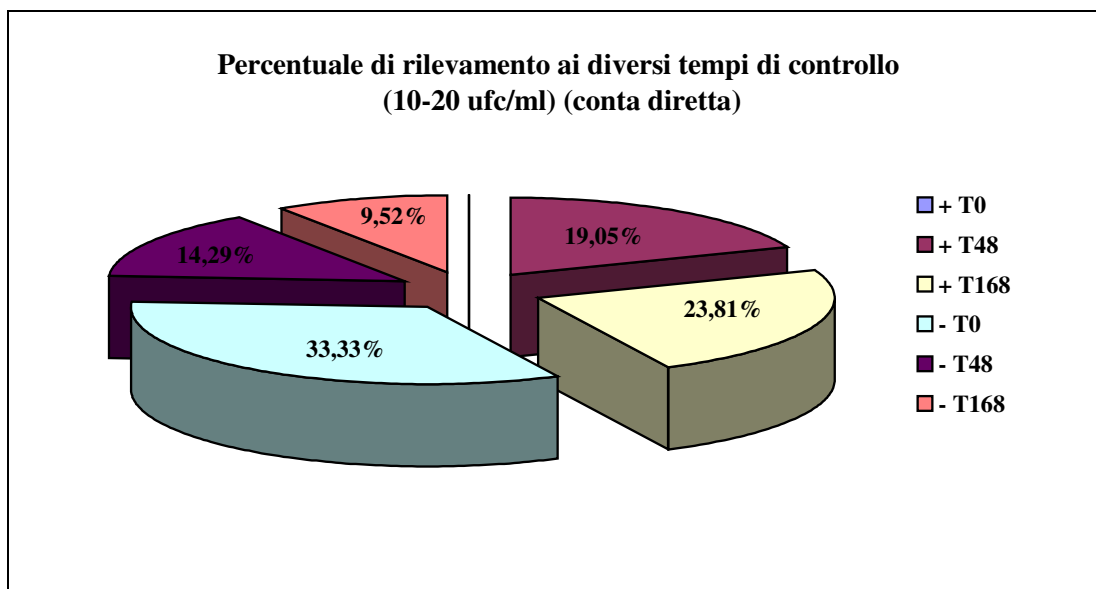
Campione	Carico inoculato	T0	T48	T168	Identificazione API
L1D2	10 ufc/ml	-	-	-	
L3D2	10 ufc/ml	-	-	-	
L6D2	10 ufc/ml	-	-	+1,95x10 <sup>4</sup> ufc/ml 4,29 Log	<i>L.monocytogenes</i> (T168)
L14D2	10 ufc/ml	-	+50 ufc/ml 1,69 Log	+2,3 x10 <sup>3</sup> ufc/ml 3,36 Log	<i>L.monocytogenes</i> (T48-T168)
L15D2	10 ufc/ml	-	+36 ufc/ml 1,55 Log	+1,56x10 <sup>2</sup> ufc/ml 2,19 Log	<i>L.monocytogenes</i> (T48-T168) <i>L. ivanovii</i> 150 ufc/ml (T48)
L11D2	20 ufc/ml	-	+1,82x10 <sup>2</sup> ufc/ml 2,26 Log	+ 150 ufc/ml 2,17 Log	<i>L.monocytogenes</i> (T48-T168)
L13D2	20 ufc/ml	-	+1,5x10 <sup>2</sup> ufc/ml 2,17 Log	+ 50 ufc/ml 1,7 Log	<i>L.monocytogenes</i> (T48-T168)

Tab. 12: rilevamento con contaminazioni artificiali di *L. monocytogenes* pari a 10-20 ufc/ml (conta diretta)



**Grafico 8: isolamento di *L. monocytogenes* (10-20 ufc/ml) su latte tal quale (conta diretta)**

La percentuale di negativi è molto bassa e pari al 28,57%. Il grafico 9 descrive la sensibilità del metodo ai vari tempi di controllo. Come si può notare con contaminazioni, del microrganismo in oggetto, pari a 10-20 ufc/ml, la percentuale di rilevamento maggiore si osserva al T168 pari al 23,81%. Al T0, con inoculi così bassi, la percentuale di isolamento è pari allo 0%.



**Grafico 9: rilevamento ai tempi T0, T48, T168 con inoculi pari a 10-20 ufc/ml**

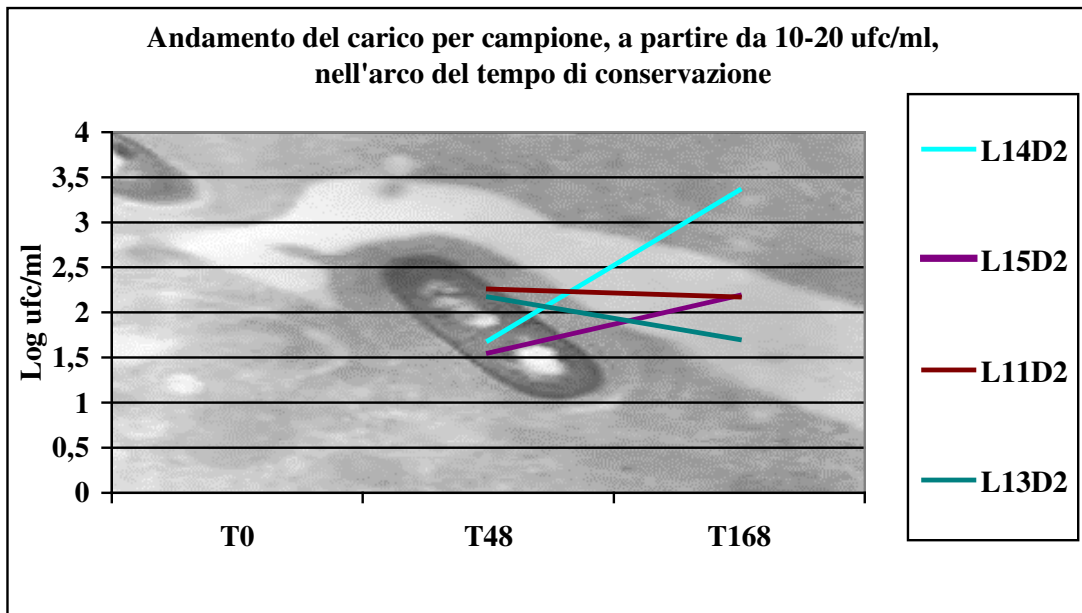


Grafico 10: andamento del carico di *L. monocytogenes* (10-20 ufc/ml) nei campioni L14D2, L15D2, L11D2, L13D2

Come si può osservare dal grafico 10, il carico microbico relativo a *L. monocytogenes*, nei casi in cui sia stato possibile definirlo, non ha sempre un andamento linearmente crescente, nell'arco degli otto giorni di conservazioni, partendo da valori iniziali pari a 10-20 ufc/ml. Nel campione L11D2 rimane pressoché costante mentre relativamente al campione L13D2 decresce.

#### - Contaminazioni pari a 30-40 ufc/ml

Campione	Carico inoculato	T0	T48	T168	Identificazione API
L4D1	30ufc/ml	+	+7,6x10 <sup>4</sup> ufc/ml 4,8 Log	+2,07x10 <sup>5</sup> ufc/ml 5,32 Log	<i>L.monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L5D2	30ufc/ml	-	+	+	<i>L.monocytogenes</i> (T48-T168)
L8D2	40ufc/ml	+ 50ufc/ml 1,69 Log	-	+7,27x10 <sup>2</sup> ufc/ml 2,86 Log	<i>L.monocytogenes</i> (T0-T168)
L10D3	40ufc/ml	+50ufc/ml 1,69 Log	+3x10 <sup>2</sup> ufc/ml 2,4 Log	+50ufc/ml 1,69 Log	<i>L.monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L12D2	40ufc/ml	+ 27ufc/ml 1,43 Log	+ 4x10 <sup>2</sup> ufc/ml 2,6 Log	+200ufc/ml 2,3 Log	<i>L.monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L17D3	40ufc/ml	+ 30ufc/ml 1,48 Log	+ 40 ufc/ml 1,60 Log	+ 55 ufc/ml 1,74 Log	<i>L.monocytogenes</i> (T0-T48-T168)

Tab. 13: rilevamento con contaminazioni artificiali di *L. monocytogenes* pari a 30– 40 ufc/ml (conta diretta)

Come si può notare dalla tabella 13 e dal grafico 11 in 6 campioni inoculati con carico pari a 30-40 ufc/ml la presenza di *L. monocytogenes* è stata rilevata nel 100% dei casi. In un solo

campione (L5D2) non è stato possibile determinare il carico in nessuno dei tempi di controllo previsti, per l'esiguo numero di colonie contabili, anche se il microrganismo è stato comunque isolato. Non sono state isolate altre listeriacee nei campioni in oggetto.

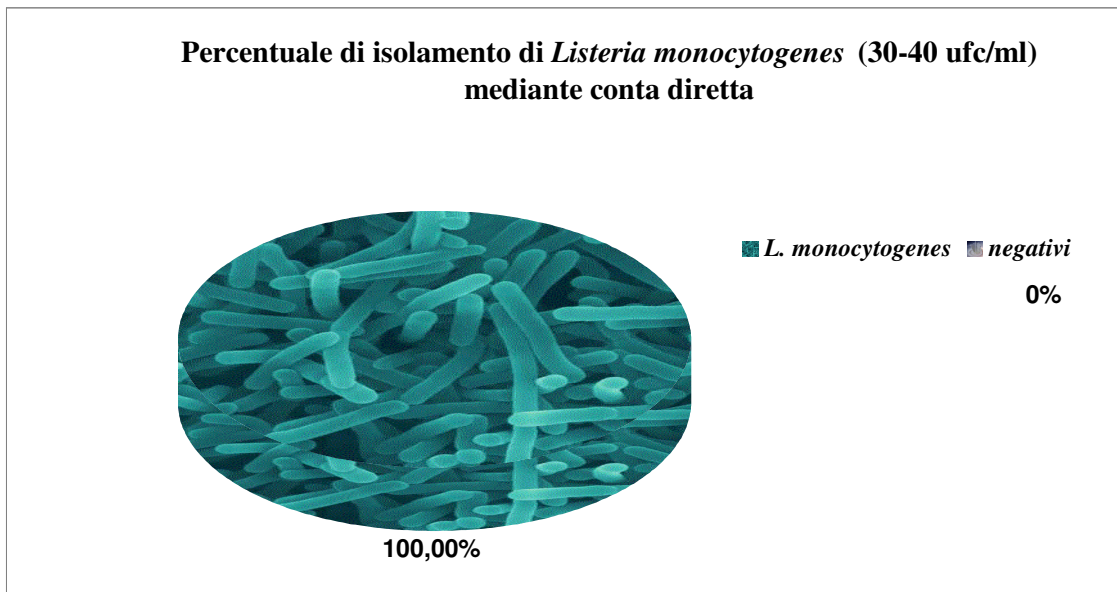


Grafico 11: isolamento di *L. monocytogenes* (30-40 ufc/ml) su latte tal quale (conta diretta)

Nel grafico n. si evidenzia la capacità del metodo ai vari tempi di controllo in tutti i campioni presi in esame, inoculati con carichi pari a 30-40 ufc/ml. La percentuale di rilevamento maggiore si osserva al T168 pari a 33,32%. Sempre elevata è la sensibilità della tecnica al T0 e al T48 corrispondente al 27,78%.

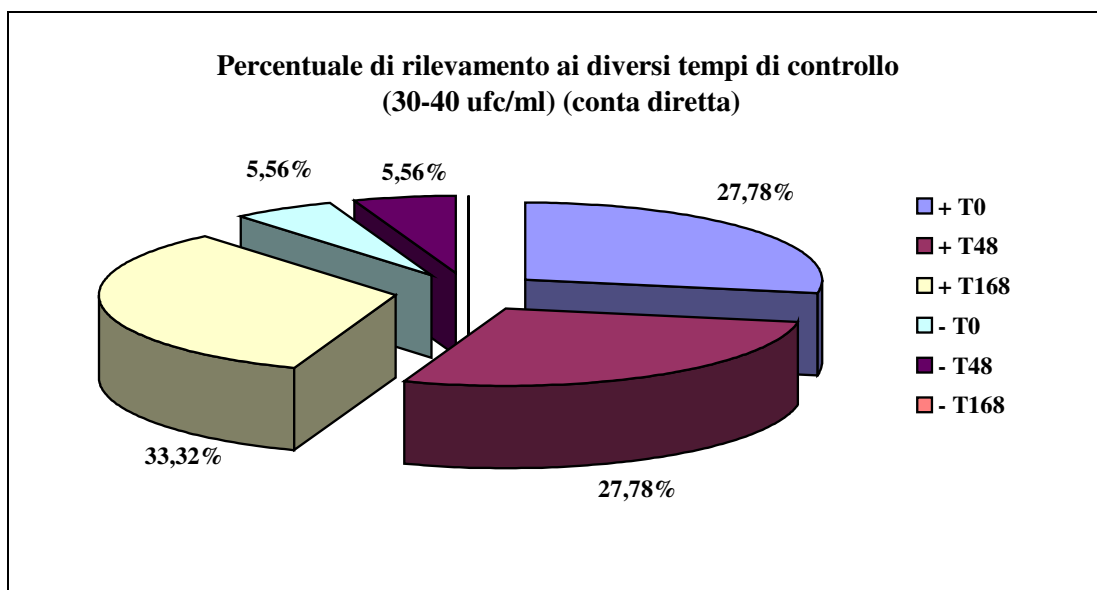


Grafico 12: rilevamento ai tempi T0, T48, T168 con inoculi pari a 30-40 ufc/ml

Nei campioni in cui è stato possibile definire l'andamento del carico, con contaminazioni iniziali pari a 30-40 ufc/ml, si può osservare che solo nell'L4D1 i valori sono linearmente crescenti. Nei campioni L10D3 e L12D2 si attesta un picco massimo al T48 successivamente al quale il carico tende a decrescere. Nel campione L17D3 la concentrazione di *L. monocytogenes* è pressoché costante nell'arco degli otto giorni di conservazione.

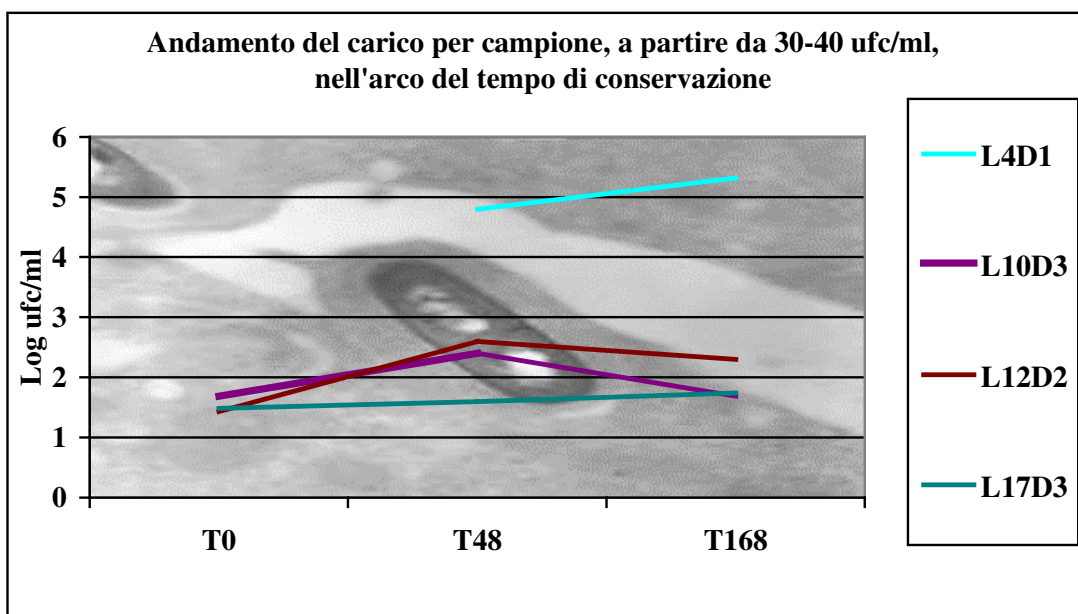


Grafico 13: andamento del carico di *L. monocytogenes* (30-40 ufc/ml) nei campioni L14D2, L15D2, L11D2, L13D2

- Contaminazioni pari a 50-70 ufc/ml

Campione	Carico inoculato	T0	T48	T168	Identificazione API
L25D3	50 ufc/ml	+ 75 ufc/ml 1,87 Log	-	+ 5 ufc/ml 0,70 Log	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T168)
L19D3	60 ufc/ml	+ 45 ufc/ml 1,65 Log	+240 ufc/ml 2,38 Log	+ 340 ufc/ml 2,53 Log	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L24D3	60 ufc/ml	+ 35 ufc/ml 1,54 Log	+ 10 ufc/ml 1 Log	+ 60 ufc/ml 1,78 Log	<i>L. monocytogenes</i> ( T0-T48-T168)
L20D3	70 ufc/ml	+ 50 ufc/ml 1,70 Log	+ 65 ufc/ml 1,81 Log	+ 130 ufc/ml 2,11 Log	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L21D3	70 ufc/ml	-	-	-	
L26D3	70 ufc/ml	-	-	-	

Tab. 14: rilevamento con contaminazioni artificiali di *L. monocytogenes* pari a 50-70 ufc/ml (conta diretta)

Nella tabella 14 e nel grafico 14 si può osservare che nei 6 campioni inoculati con carico pari a 50-70 ufc/ml, la presenza di *L. monocytogenes* è stata rilevata nel 66,67% dei casi. In due campioni (L21D3, L26D3) non è stato possibile isolare il microrganismo considerato. In tutti i campioni non è stata determinata la presenza di altre tipologie di listeria.

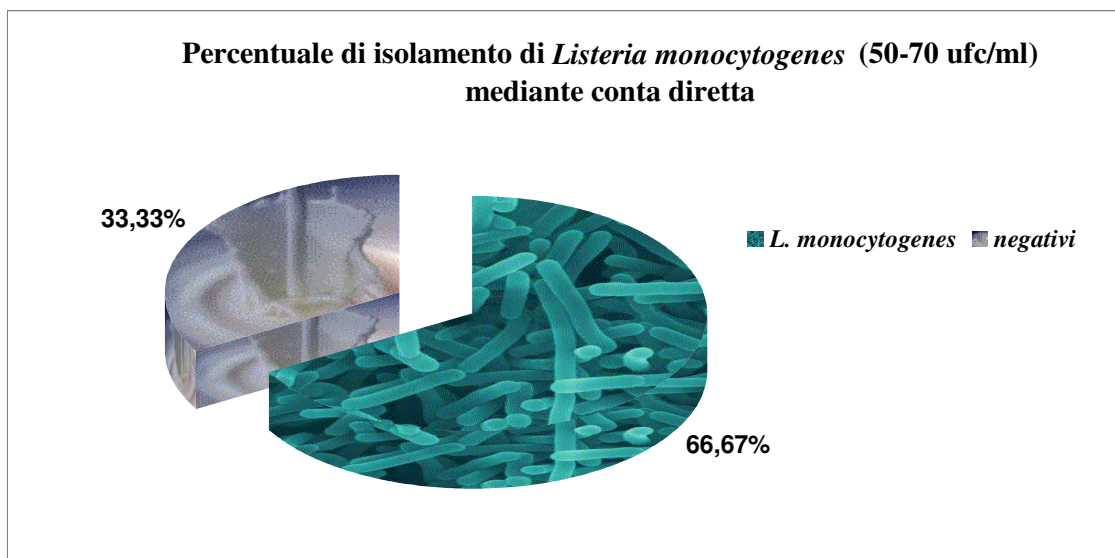


Grafico 14: isolamento di *L. monocytogenes* (50-70 ufc/ml) su latte tal quale (conta diretta)

Il grafico 15 mostra che la percentuale maggiore di rilevamento, a concentrazioni di *L. monocytogenes* iniziali pari a 50-70 ufc/ml, si è osservata al T0 e al T48 con un valore pari al 22,22%.

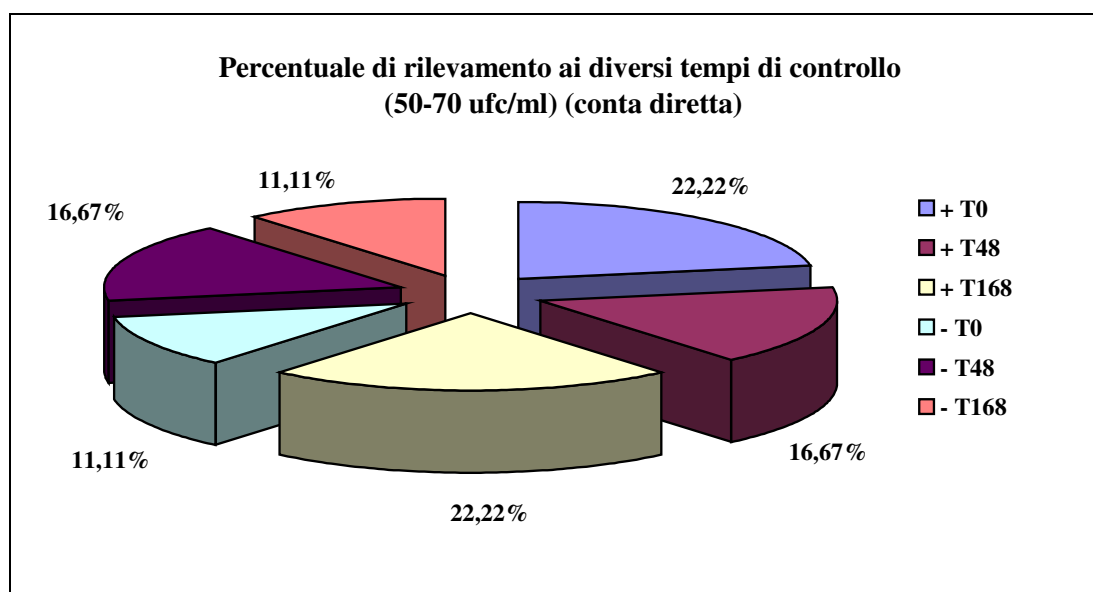


Grafico 15: rilevamento ai tempi T0, T48, T168 con inoculi pari a 50-70 ufc/ml

Per i campioni (L19D3, L20D3, L24D3), in cui è stato possibile descrivere un andamento del carico microbico relativo a *L. monocytogenes*, partendo da una contaminazione iniziale pari a 50-70 ufc/ml, si può dire che al T168 il titolo è sempre più alto rispetto al T0. Solo nel campione L24D3 il carico subisce un notevole decremento al T48 per poi risalire.

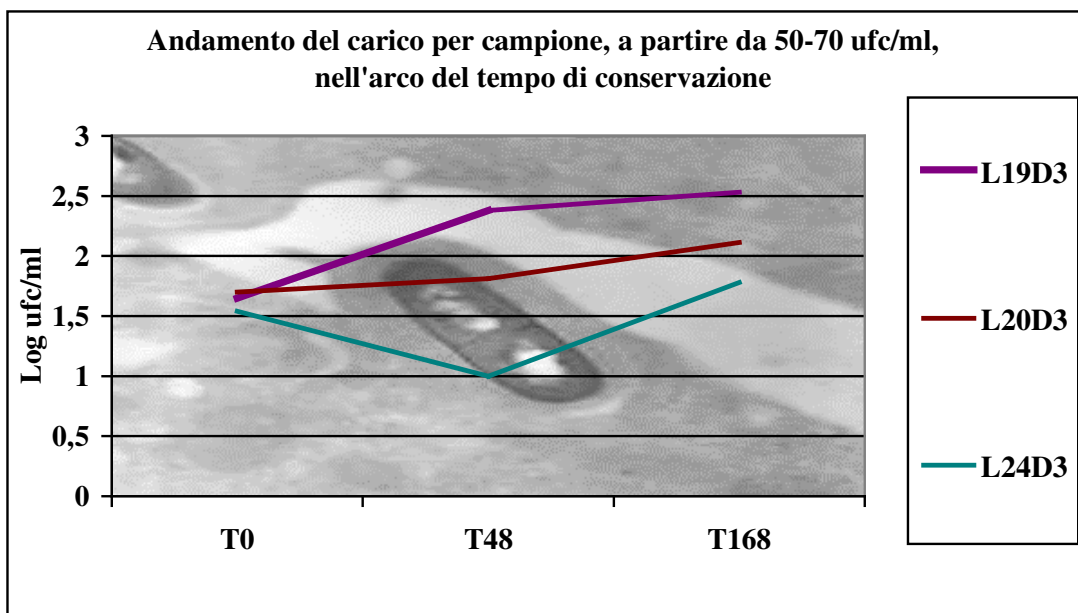


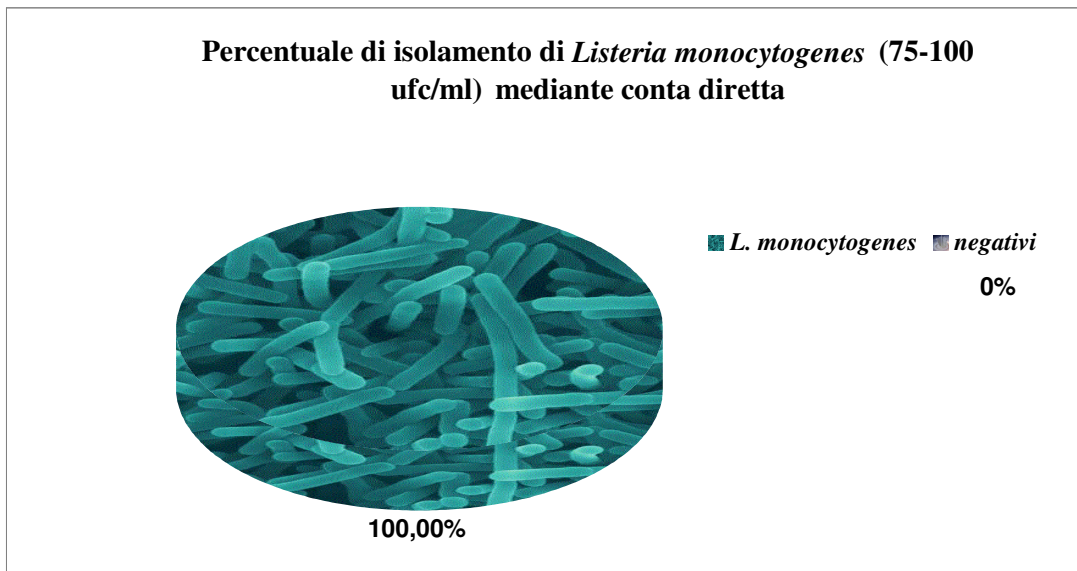
Grafico 16: andamento del carico di *L. monocytogenes* (50-70 ufc/ml) nei campioni L19D3, L20D3, L24D3

- Contaminazioni pari a 75-100 ufc/ml

Campione	Carico inoculato	T0	T48	T168	Identificazione API
L9D3	75 ufc/ml	+50 ufc/ml 1,69 Log	+2,72x10 <sup>2</sup> ufc/ml 2,43 Log	+ 5 x 10 <sup>2</sup> ufc/ml 2,69 Log	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L18D3	80 ufc/ml	+5 ufc/ml 0,70 Log	+ 20 ufc/ml 1,3 Log	+ 270 ufc/ml 2,43 Log	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L22D3	80 ufc/ml	+70 ufc/ml 1,84 Log	+ 30 ufc/ml 1,48 Log	+ 40 ufc/ml 1,60 Log	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L23D3	90 ufc/ml	+35 ufc/ml 1,54 Log	-	+ 35 ufc/ml 1,54 Log	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T168)
L2D1	100 ufc/ml	-	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T48-T168)
L7D3	100 ufc/ml	+90,1 ufc/ml 1,95 Log	+2,5 x 10 <sup>2</sup> ufc/ml 2,39 Log	+ 1,27x10 <sup>4</sup> ufc/ml 4,10 Log	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L16D3	100 ufc/ml	+35 ufc/ml 1,54 Log	+ 235 ufc/ml 2,37 Log	+ 355 ufc/ml 2,55 Log	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)

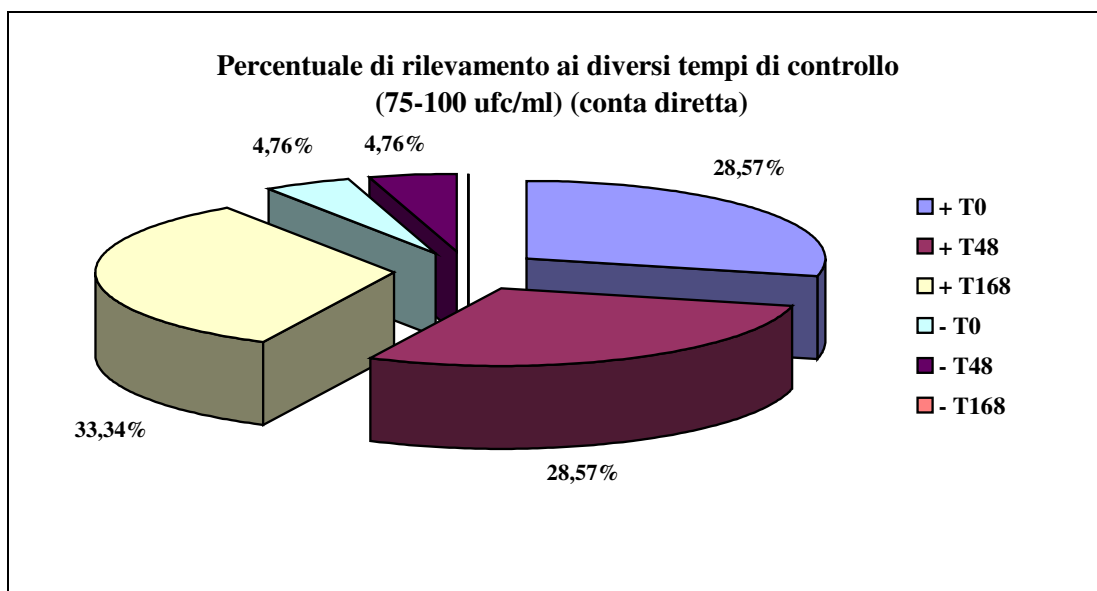
Tab. 15: rilevamento con contaminazioni artificiali di *L. monocytogenes* pari a 75-100 ufc/ml (conta diretta)

Come si può evidenziare dalla tabella 15 e dal grafico 17, con carichi corrispondenti a 75-100 ufc/ml, la tecnica della conta diretta è stata capace di isolare *L. monocytogenes* in tutti i campioni. Non è stata rilevata la contemporanea presenza di altre specie di listeria.



**Grafico 17: isolamento di *L. monocytogenes* (75-100 ufc/ml) su latte tal quale (conta diretta)**

Nel grafico 18 viene descritta la capacità di rilevamento del metodo ai vari tempi di controllo. Si può osservare che la sensibilità più alta è pari al 33,34% e relativa al T168. Le percentuali di rilevamento al T0 e al T48 sono, comunque, elevate e pari al 28,57%.



**Grafico 18: rilevamento ai tempi T0, T48, T168 con inoculi pari a 75-100 ufc/ml**

Nei campioni in cui è stato possibile costruire un andamento del carico di *L. monocytogenes*, in condizioni di contaminazioni iniziali pari a 75-100 ufc/ml, si può osservare come esso sia

linearmente crescente per i campioni L9D3, L18D3, L7D3, L16D3, mentre si mantenga all'incirca costante per L22D3.

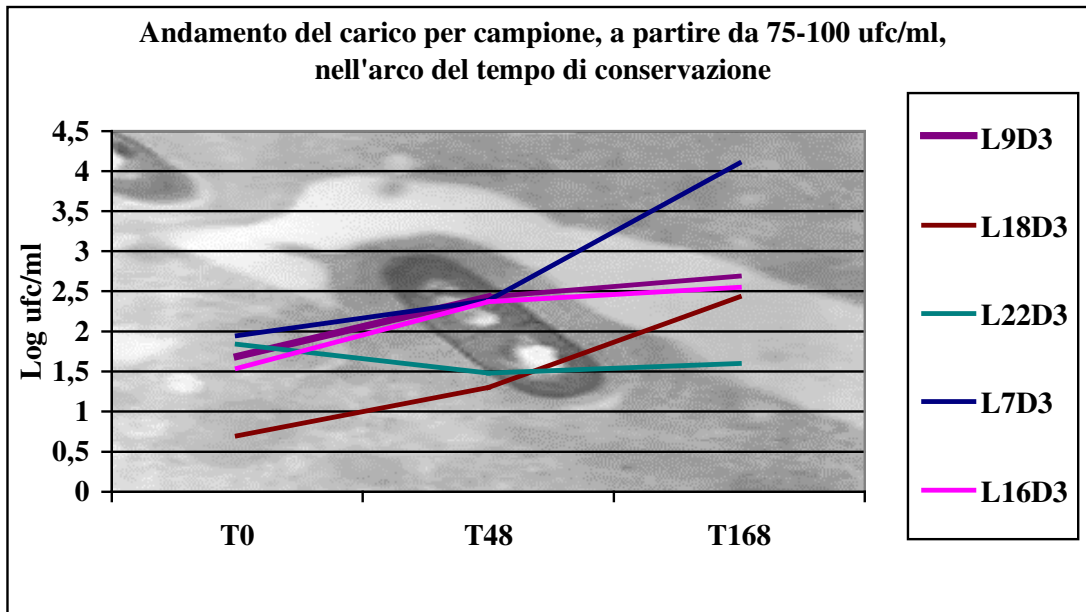


Grafico 19: andamento del carico di *L. monocytogenes* (75-100 ufc/ml) nei campioni L19D3, L20D3, L24D3

### 3.4 Ricerca di *Listeria monocytogenes* in latte crudo inoculato, con metodo MPN

#### - Contaminazioni pari a 10-20 ufc/ml

Si può osservare nella tabella 16 e dal grafico 20 che la tecnica MPN ha permesso di isolare il microorganismo ricercato, ad una concentrazione iniziale pari a 10-20 ufc/ml, in 6 campioni su 7 (85,71%). Non è stata rilevata la presenza di altre listeriaccee.

Campione	Carico inoculato	T0	T48	T168	Identificazione API
L1D2	10 ufc/ml	-	-	+	<i>L. monocytogenes</i> (T168)
L3D2	10 ufc/ml	-	-	-	
L6D2	10 ufc/ml	-	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T48-T168)
L14D2	10 ufc/ml	-	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L15D2	10 ufc/ml	-	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48)
L11D2	20 ufc/ml	-	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L13D2	20 ufc/ml	-	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)

Tab. 16: rilevamento con contaminazioni artificiali di *L. monocytogenes* pari a 10–20 ufc/ml (MPN)

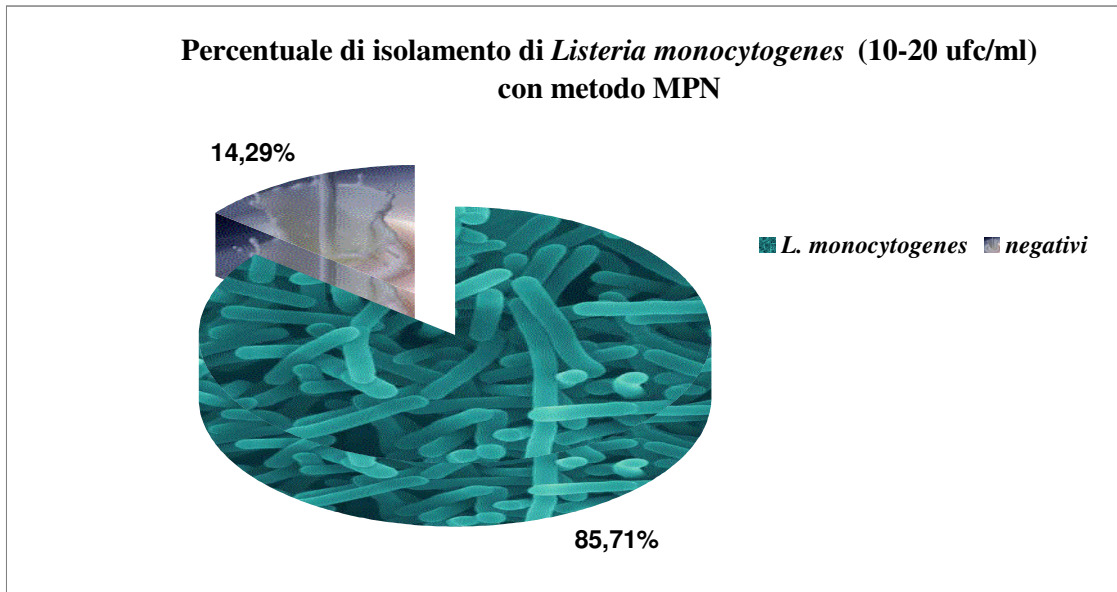


Grafico 20: isolamento di *L. monocytogenes* (10-20 ufc/ml) su latte tal quale (MPN)

La percentuale di rilevamento maggiore, con concentrazioni iniziali pari 10-20 ufc/ml, è stata osservata sia nel T48, sia nel T168 con un valore di 23,81%. Non di molto si discosta la percentuale di isolamento al T0 che risulta essere pari al 19,05%.

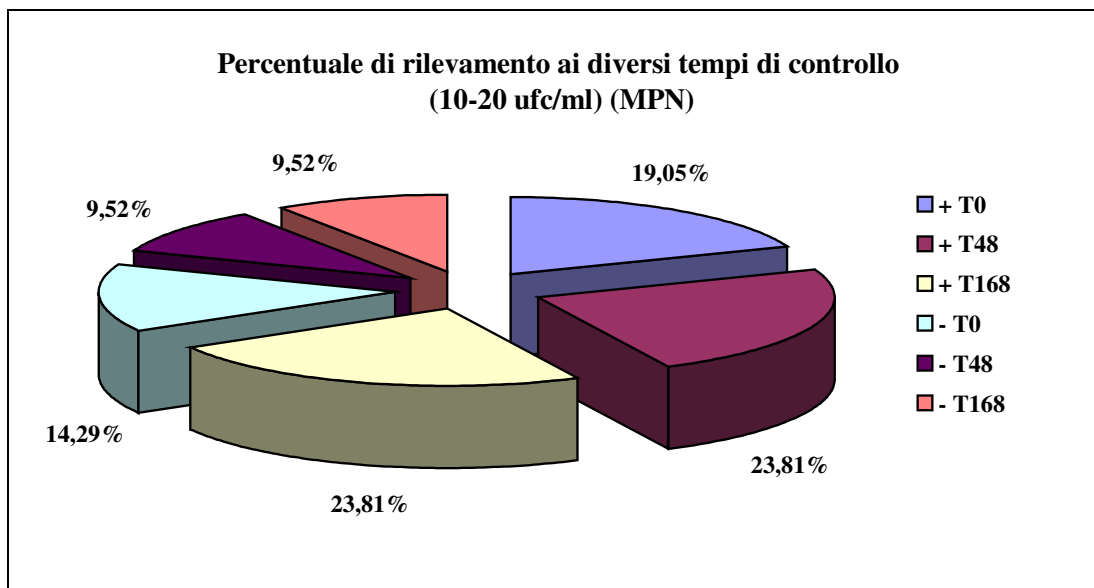


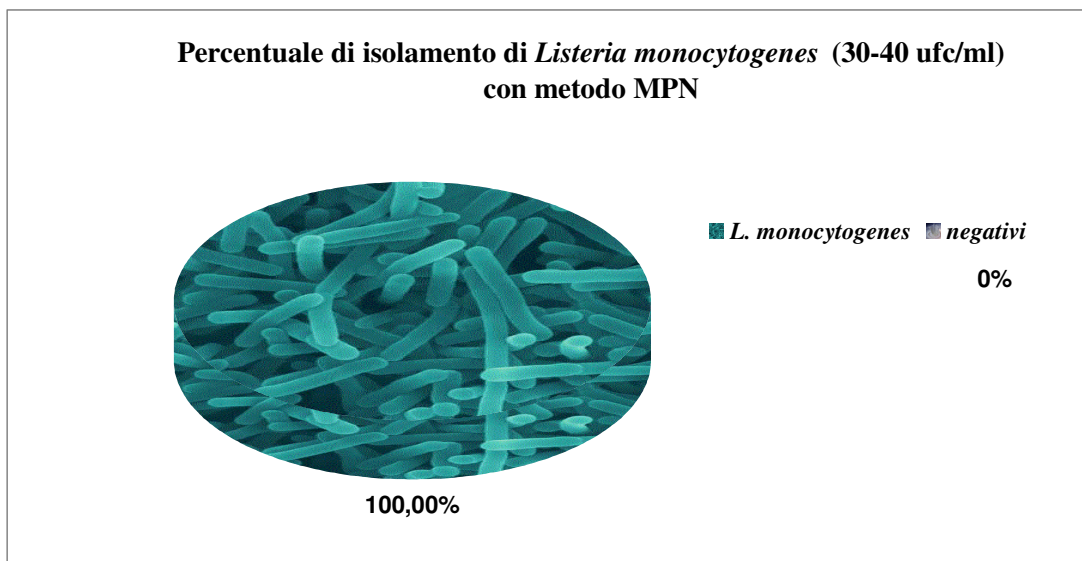
Grafico 21: rilevamento ai tempi T0, T48, T168 con inoculi pari a 10-20 ufc/ml

**- Contaminazioni pari a 30-40 ufc/ml**

La tabella 17 e il grafico 22 evidenziano come la tecnica MPN abbia permesso di rilevare *Listeria monocytogenes*, a valori di carico iniziale pari a 30-40 ufc/ml, in tutti i campioni. Non sono state isolate altre listeriaccee.

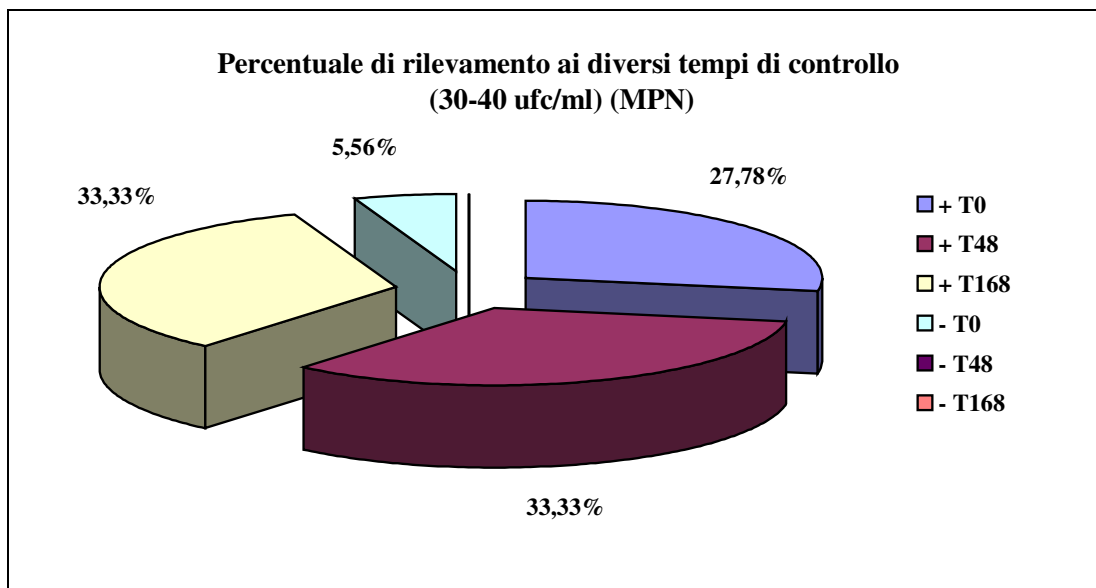
Campione	Carico inoculato	T0	T48	T168	Identificazione API
L4D1	30 ufc/ml	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L5D2	30 ufc/ml	-	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T48-T168)
L8D2	40 ufc/ml	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L10D3	40 ufc/ml	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L12D2	40 ufc/ml	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L17D3	40 ufc/ml	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)

**Tab. 17: rilevamento con contaminazioni artificiali di *L. monocytogenes* pari a 30–40 ufc/ml (MPN)**



**Grafico 22: isolamento di *L. monocytogenes* (30-40 ufc/ml) su latte tal quale (MPN)**

Come si può notare nel grafico 23 la percentuale maggiore di rilevamento, a contaminazione di *L. monocytogenes* di 30-40 ufc/ml, è pari al 33,33% e corrisponde sia al T48 che al T168. La percentuale con un valore di 27,78% relativa al T0 è dovuta al mancato isolamento del microrganismo nel campione L5D2.



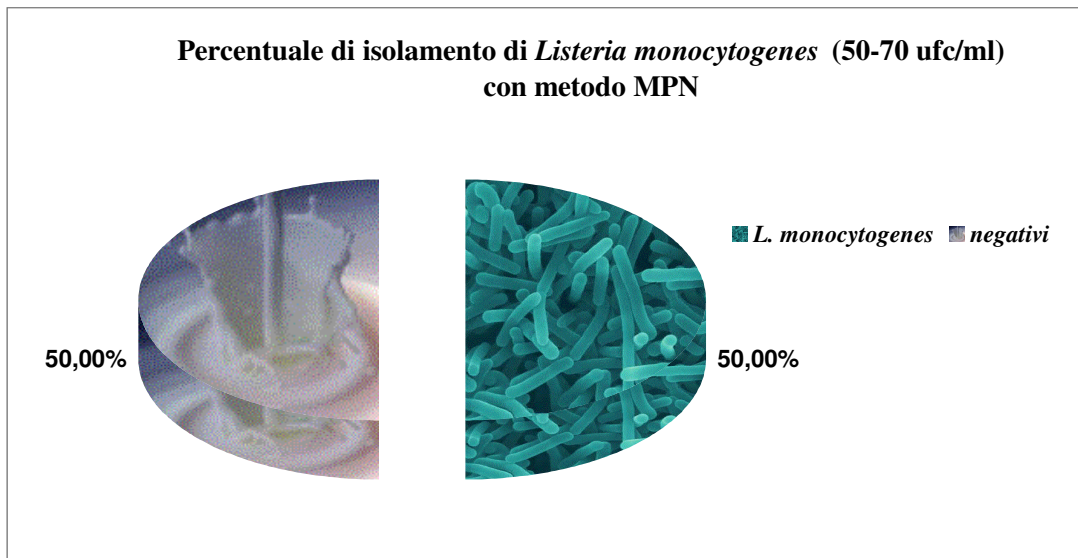
**Grafico 23: rilevamento ai tempi T0, T48, T168 con inoculi pari a 30-40 ufc/ml**

#### **- Contaminazioni pari a 50-70 ufc/ml**

Come si può rilevare dalla tabella 18 e dal grafico 24 sottostanti la presenza del patogeno oggetto di questa indagine è stata osservata in tre campioni su sei (50%), contaminati con un carico pari a 50-70 ufc/ml. Non è stata evidenziata la presenza di altre listerieree.

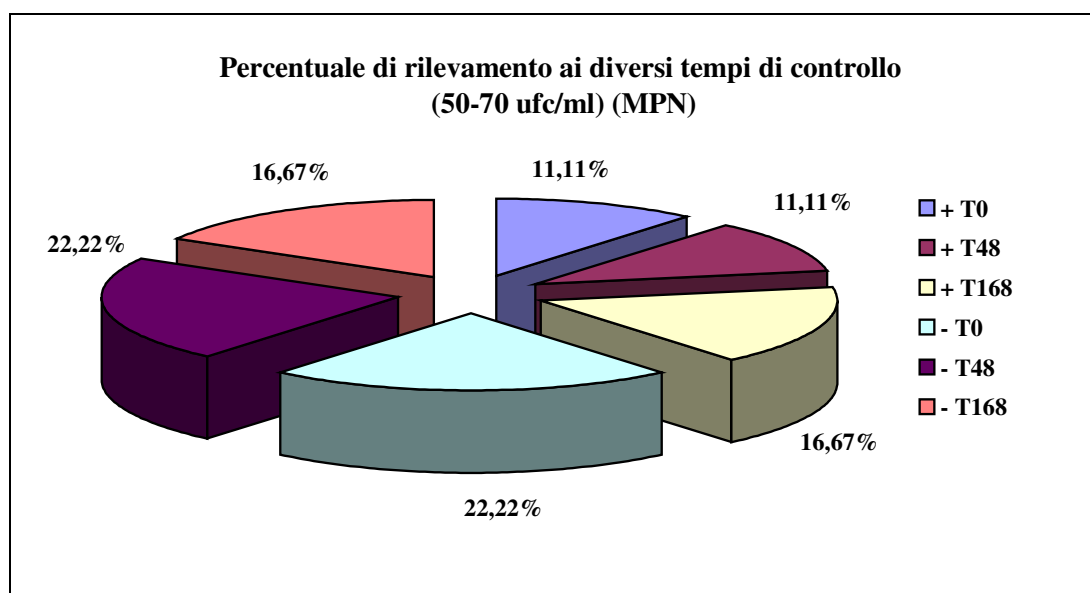
Campione	Carico inoculato	T0	T48	T168	Identificazione API
L25D3	50 ufc/ml	-	-	-	
L19D3	60 ufc/ml	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L24D3	60 ufc/ml	-	-	-	
L20D3	70 ufc/ml	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L21D3	70 ufc/ml	-	-	+	<i>L. monocytogenes</i> (T168)
L26D3	70 ufc/ml	-	-	-	

**Tab. 18: rilevamento con contaminazioni artificiali di *L. monocytogenes* pari a 50-70 ufc/ml (MPN)**



**Grafico 24:** isolamento di *L. monocytogenes* (50-70 ufc/ml) su latte tal quale (MPN)

Il grafico sottostante descrive la capacità della tecnica MPN di rilevare carichi iniziali con valori di 50-70 ufc/ml, inoculati artificialmente. Si può osservare che, pur partendo da contaminazioni relativamente elevate, la percentuale di isolamento maggiore è stata evidenziata al T168 con un valore pari al 16,67%. La percentuale di rilevamento al T0 e al T48 si è dimostrata minore rispetto al T168 e pari all' 11,11%.



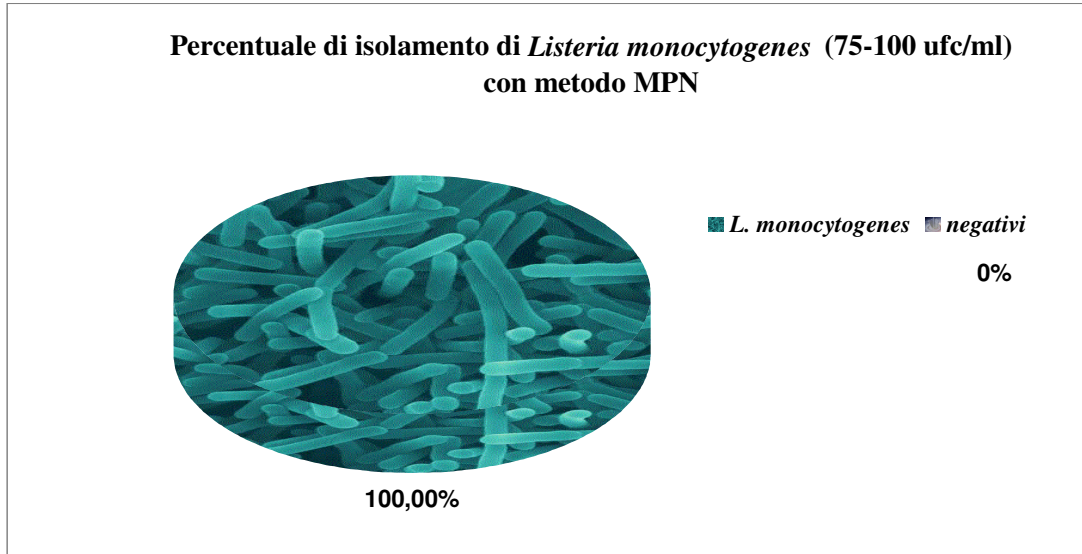
**Grafico 25:** rilevamento ai tempi T0, T48, T168 con inoculi pari a 50-70 ufc/ml

**- Contaminazioni pari a 75-100 ufc/ml**

Dall'osservazione della tabella 19 e dal grafico 26, si può sottolineare che a carichi di contaminazione artificiale pari a 75-100 ufc/ml, la presenza di *L. monocytogenes* è stata riscontrata in tutti i campioni e quindi nel 100% dei casi. Non è stata isolata nessun'altra tipologia di listeria.

Campione	Carico inoculato	T0	T48	T168	Identificazione API
L9D3	75 ufc/ml	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L18D3	80 ufc/ml	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L22D3	80 ufc/ml	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L23D3	90 ufc/ml	+	+	-	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48)
L2D1	100 ufc/ml	-	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T48-T168)
L7D3	100 ufc/ml	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)
L16D3	100 ufc/ml	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i> (T0-T48-T168)

**Tab. 19:** rilevamento con contaminazioni artificiali di *L. monocytogenes* pari a 75–100 ufc/ml (MPN)



**Grafico 26:** isolamento di *L. monocytogenes* (75-100 ufc/ml) su latte tal quale (MPN)

Il grafico 27 mostra che la percentuale maggiore di rilevamento, con una contaminazione iniziale di *L. monocytogenes* pari a 75-100 ufc/ml, corrisponde al T48 (33,34%). Ai tempi di controllo T0 e T168, i valori sono sempre relativamente alti e uguali al 28,57%.

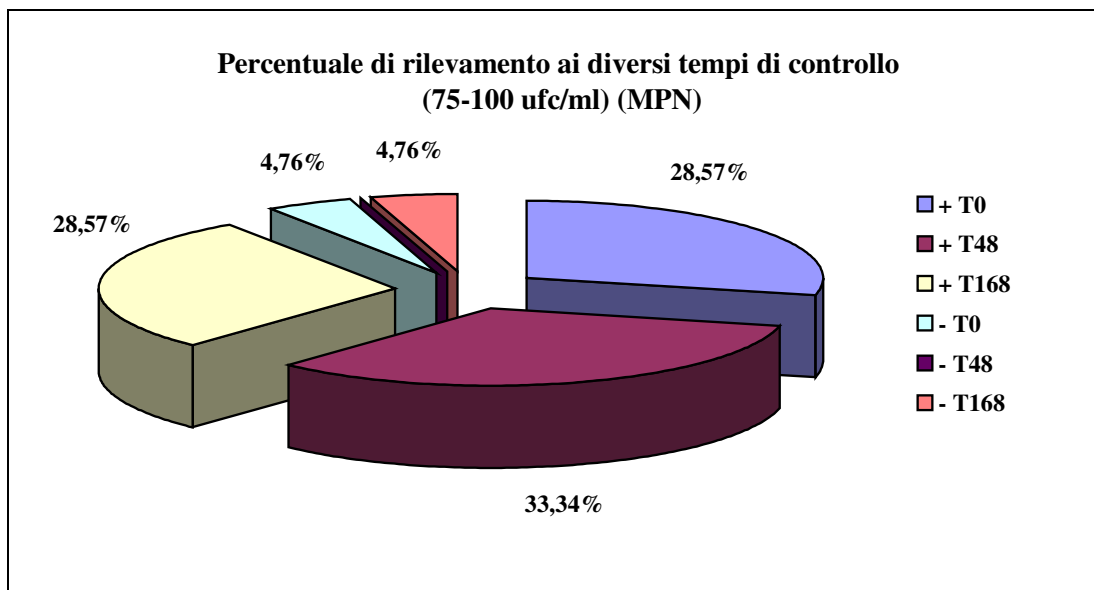


Grafico 27: rilevamento ai tempi T0, T48, T168 con inoculi pari a 75-100 ufc/ml

### 3.5 Carico microbico mesofilo aerobio

- Distributore D1

Campione	T0	T48	T168
L2D1	2,53 x 10 <sup>6</sup> 6,40 Log	3,1 x 10 <sup>9</sup> 9,49 Log	3,3 x 10 <sup>6</sup> 6,52 Log
L4D1	2,3 x 10 <sup>6</sup> 6,36 Log	8,2 x 10 <sup>8</sup> 8,91 Log	6,43 x 10 <sup>8</sup> 8,8 Log

Tab. 20: numerazione colonie aerobie mesofile a 30 °C (D1) (NORMA ISO 4833:2004)

Il grafico 28 mostra l'andamento del carico mesofilo aerobio, nell'arco degli otto giorni di conservazione relativo, ai due campioni L2D1 e L4D1. Si può osservare, in entrambi i casi, che il carico tende a crescere sino al T48 e successivamente a decrescere.

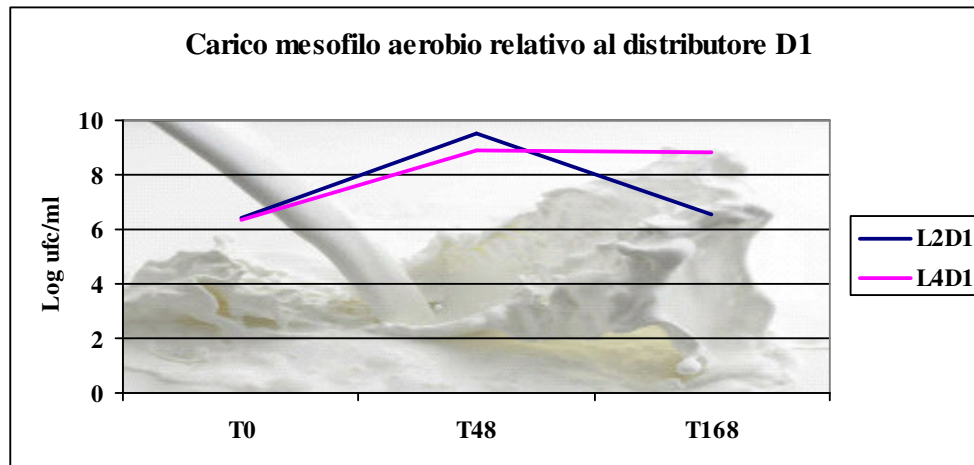


Grafico 28: andamento del carico mesofilo aerobio relativo al distributore D1

- Distributore D2

Campione	T0	T48	T168
L1D2	4,17 x 10 <sup>4</sup> 4,62 Log	3,34 x 10 <sup>7</sup> 7,52 Log	2,14 x 10 <sup>8</sup> 8,33 Log
L3D2	7,6 x 10 <sup>4</sup> 4,88 Log	3,5 x 10 <sup>7</sup> 7,5 Log	5,84 x 10 <sup>9</sup> 9,76 Log
L5D2	2,5 x 10 <sup>4</sup> 4,39 Log	4,6 x 10 <sup>5</sup> 5,66 Log	9,9 x 10 <sup>8</sup> 8,99 Log
L6D2	6,40 x 10 <sup>6</sup> 6,81 Log	1,66 x 10 <sup>8</sup> 8,22 Log	1,16 x 10 <sup>8</sup> 8,06 Log
L8D2	2,0 x 10 <sup>4</sup> 4,30 Log	6,86 x 10 <sup>5</sup> 5,84 Log	8,91 x 10 <sup>8</sup> 8,95 Log
L11D2	- 9,38 Log	- 9,45 Log	- 10,60 Log
L12D2	- 5,40 Log	- 5,75 Log	- 8,15 Log
L13D2	- 4,90 Log	- 5,70 Log	- 7,60 Log
L14D2	- 3,80 Log	- 4,50 Log	- 5,90 Log
L15D2	- 4,90 Log	- 5,30 Log	- 6,90 Log

Tab. 21: numerazione colonie areobiche mesofile a 30 °C (D2) (NORMA ISO 4833:2004)

Come si può osservare dal grafico 29 l'andamento del carico microbico a 30 °C relativo al distributore D2, è linearmente crescente in quasi tutti i campioni. Solo nel campione L6D2 si osserva una lieve diminuzione del carico tra il T48 e il T168.

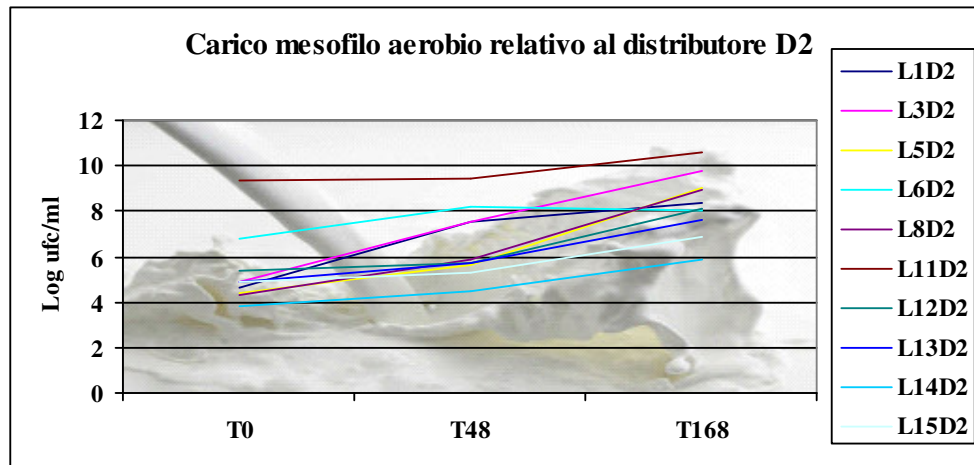


Grafico 29: andamento del carico mesofilo aerobio relativo al distributore D2

- Distributore D3

Campione	T0	T48	T168
L7D3	3,60 x 10 <sup>5</sup> 5,56 Log	2,50 x 10 <sup>9</sup> 9,40 Log	3,73 x 10 <sup>8</sup> 8,57 Log
L9D3	3,81 x 10 <sup>5</sup> 5,58 Log	7,68 x 10 <sup>6</sup> 6,89 Log	5,66 x 10 <sup>8</sup> 8,75 Log
L10D3	1,31 x 10 <sup>5</sup> 5,12 Log	4,36 x 10 <sup>6</sup> 6,64 Log	1,83 x 10 <sup>8</sup> 8,26 Log
L16D3	2,30 x 10 <sup>4</sup> 4,36 Log	3,03 x 10 <sup>6</sup> 6,48 Log	- 7,86 Log
L17D3	4,09 x 10 <sup>5</sup> 5,61 Log	5,04 x 10 <sup>5</sup> 5,70 Log	7,03 Log
L18D3	2,40 x 10 <sup>6</sup> 6,38 Log	1,32 x 10 <sup>5</sup> 5,12 Log	- 8,71 Log
L19D3	3,0 x 10 <sup>5</sup> 5,47 Log	3,80 x 10 <sup>6</sup> 6,58 Log	- 7,71 Log
L20D3	5,04 x 10 <sup>5</sup> 5,70 Log	3,80 x 10 <sup>6</sup> 6,58 Log	- 8,81 Log
L21D3	/	6,81 x 10 <sup>6</sup> 6,83 Log	1,13 x 10 <sup>7</sup> 7,05 Log
L22D3	2,71 x 10 <sup>4</sup> 4,43 Log	4,36 x 10 <sup>4</sup> 4,64 Log	2,68 x 10 <sup>7</sup> 7,43 Log
L23D3	3,64 x 10 <sup>3</sup> 3,56 Log	8,1 x 10 <sup>3</sup> 3,9 Log	1,27 x 10 <sup>5</sup> 5,10 Log
L24D3	1,0 x 10 <sup>4</sup> 4 Log	6,67 x 10 <sup>3</sup> 3,82 Log	5,86 x 10 <sup>5</sup> 5,77 Log
L25D3	4,5 x 10 <sup>3</sup> 3,65 Log	9,55 x 10 <sup>3</sup> 3,98 Log	2,65 x 10 <sup>7</sup> 7,42 Log
L26D3	5,09 x 10 <sup>4</sup> 4,71 Log	2,09 x 10 <sup>6</sup> 6,32 Log	2,8 x 10 <sup>7</sup> 7,45 Log

Tab. 22: numerazione colonie areobiche mesofile a 30 °C (D3) (NORMA ISO 4833:2004)

Il grafico 30 evidenzia l'andamento linearmente crescente del carico mesofilo aerobio per quasi tutti i campioni relativi al distributore D3. Nel campione L7D3 il carico si attesta ad un picco massimo al terzo giorno di conservazione per poi decrescere. Nel campione L24D3 il carico è inferiore al T48 rispetto al T0 e al T168.

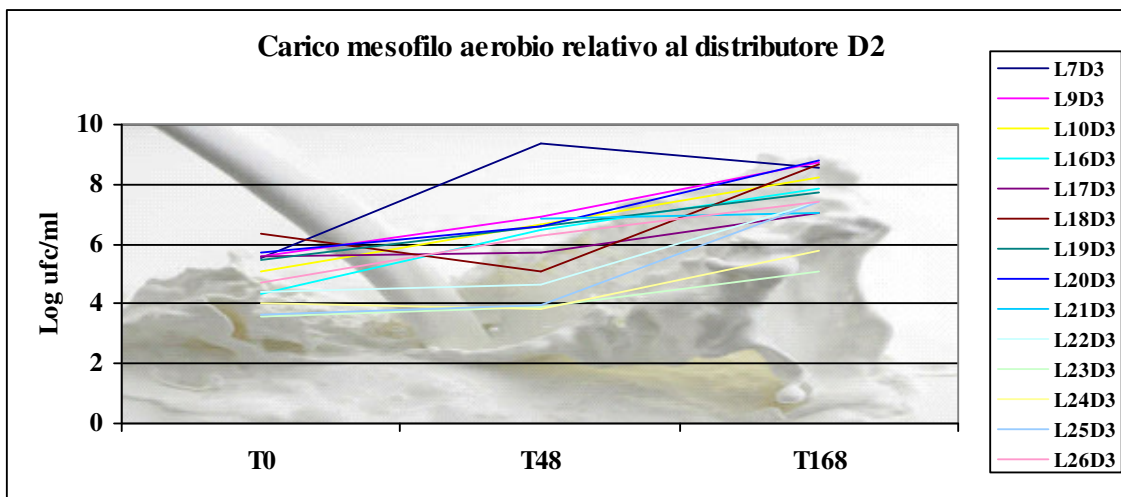


Grafico 30: andamento del carico mesofilo aerobio relativo al distributore D3

### 3.6 Valutazione del pH

La tabella 23 evidenzia come il pH del latte crudo tal quale si mantenga pressoché stabile nell'arco degli otto giorni di conservazione, con valori vicini alla neutralità. Solo nei campioni L1D2, L2D1, L3D2, L4D1, L5D2 e L9D3 il pH si abbassa intorno al valore di 5 al T168.

Campione	T0	T48	T168	Campione	T0	T48	T168
L1D2	6,70	6,48	4,56	L14D2	6,76	6,65	6,46
L2D1	6,64	6,42	4,32	L15D2	6,88	6,66	6,58
L3D2	6,57	6,53	4,64	L16D3	7,43	7,31	6,51
L4D1	6,73	6,52	4,51	L17D3	6,65	7,41	6,41
L5D2	6,80	6,56	4,54	L18D3	6,63	6,61	6,08
L6D2	6,63	6,61	6,49	L19D3	7,27	6,64	6,51
L7D3	6,74	6,87	6,45	L20D3	7,11	6,58	6,18
L8D2	6,69	6,69	6,51	L21D3	6,48	6,55	6,54
L9D3	6,73	6,66	5,87	L22D3	6,58	6,66	6,57
L10D3	6,74	6,71	6,45	L23D3	6,68	6,60	6,66
L11D2	6,69	6,69	6,57	L24D3	6,74	6,63	6,65
L12D2	6,74	6,65	6,51	L25D3	6,71	6,63	6,58
L13D2	6,75	6,73	6,50	L26D3	6,54	6,57	6,57

Tab. 23: valori di pH per tutti i campioni ai vari tempi di controllo

#### 4. Conclusioni e discussioni

Dal punto di vista microbiologico il latte crudo per l'alimentazione umana diretta, ai sensi del Regolamento (CE) n. 2073/2005, può essere considerato un "alimento pronto al consumo" appartenente quindi al gruppo dei prodotti ready-to-eat (RTE). Grazie all'installazione di distributori automatici, la vendita del latte crudo è ormai una realtà conosciuta su tutto il territorio italiano e trova ampi margini di gradimento nei consumatori grazie all'indiscutibile carattere nutrizionale e all'elevata qualità organolettica. Al contempo però è necessario asserire che il consumo di latte crudo rappresenta un rischio potenziale per il consumatore, in particolare per le fasce più sensibili della popolazione. Questo prodotto come tutti gli alimenti RTE (The EFSA Journal 2007) è infatti un substrato ideale per la crescita di microrganismi patogeni ed in particolare di *Listeria monocytogenes*, oggetto di questa indagine. Il regolamento CE n. 2073/2005 stabilisce il limite di 100 ufc/ml durante il periodo di conservabilità del prodotto e l'assenza in 25 ml prima dell'immissione sul mercato. I dati raccolti in questa indagine sono stati ottenuti dal confronto fra la metodica suggerita dal regolamento sopra citato (NORMA ISO 11290-1 e 2-2005) e la tecnica Most Probable Number (MPN) (Reg. CE n. 2073/2005). Relativamente alla ricerca su latte crudo tal quale si può osservare che entrambi le metodiche hanno permesso di rilevare la presenza di *L. monocytogenes* in un solo campione (L7D3) al T48. Quindi un solo campione su 26 (3,85%) è risultato contaminato dal patogeno in oggetto. E' stata inoltre confermata la presenza di *L. ivanovii* nel campione di latte crudo tal quale L2D1 al T168 sia dalla conta diretta che dal metodo MPN. Nello stesso campione invece il metodo MPN non è stato capace di isolare *L. grayi* al T168, rilevata invece dalla metodica fissata dal Reg. CE n. 2073/2005. La tecnica MPN ha permesso di rilevare *L. grayi* nel campione L3D2 al T168 quando invece la conta diretta ha osservato solo la presenza di *Listeria* spp..

A differenza del Most Probable Number la metodica descritta nella norma ISO 11290-1 e 2-2005 è capace di discriminare la presenza di *Listeria* spp. da *L. monocytogenes*. Nel latte tal quale il 42,30% dei campioni è risultato contaminato da *Listeria* spp., il 3,85% contemporaneamente da *Listeria* spp. e da *L. monocytogenes* e il 3,85% contemporaneamente da *Listeria* spp., *L. ivanovii* e da *L. grayi*. Ne è risultato quindi che il 30% dei campioni di latte crudo era contaminato da *Listeria* spp., indice di una scarsa igiene delle fasi di produzione o dei distributori. Altri autori confermano la presenza di *Listeria* spp., ad alte percentuali, in campioni di latte crudo (Lovett J. *et al.*, 2006). In 9 campioni su 26 (34,61%),

*Listeria spp.* è stata individuata subito al T0. Dal grafico 31 si può evincere che il latte crudo maggiormente contaminato proveniva dal D2 (60%).

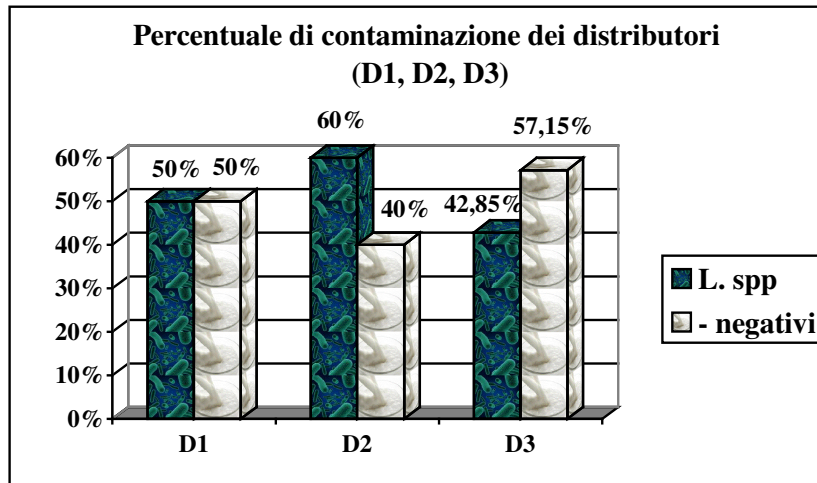


Grafico 31: percentuale di contaminazione da *L. spp.* dei diversi distributori

Nel grafico 32 si può osservare il confronto fra le due metodiche utilizzate per la ricerca di *L. monocytogenes* in latte crudo contaminato. Le due tecniche si sono dimostrate ugualmente sensibili per carichi di 30-40 e 75-100 ufc/ml. Relativamente all'inoculo di 10-20 ufc/ml la tecnica MPN si è dimostrata più sensibile rispetto alla conta diretta, il microorganismo in oggetto è stato isolato, infatti, nell'85,71% dei casi con il metodo MPN rispetto al 71,43% mediante conta diretta. Diversamente, con carichi pari a 50-70 ufc/ml la conta diretta è riuscita a rilevare la presenza del patogeno nel 66,67% rispetto al 50% della tecnica MPN.

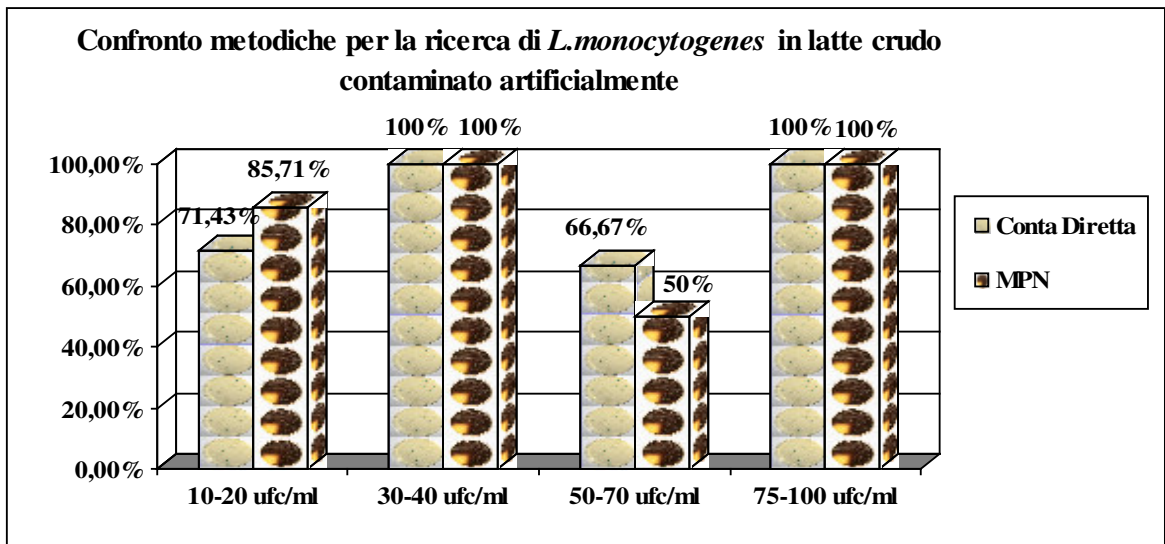


Grafico 32: confronto conta diretta-MPN per la ricerca di *L. monocytogenes* in latte crudo inoculato

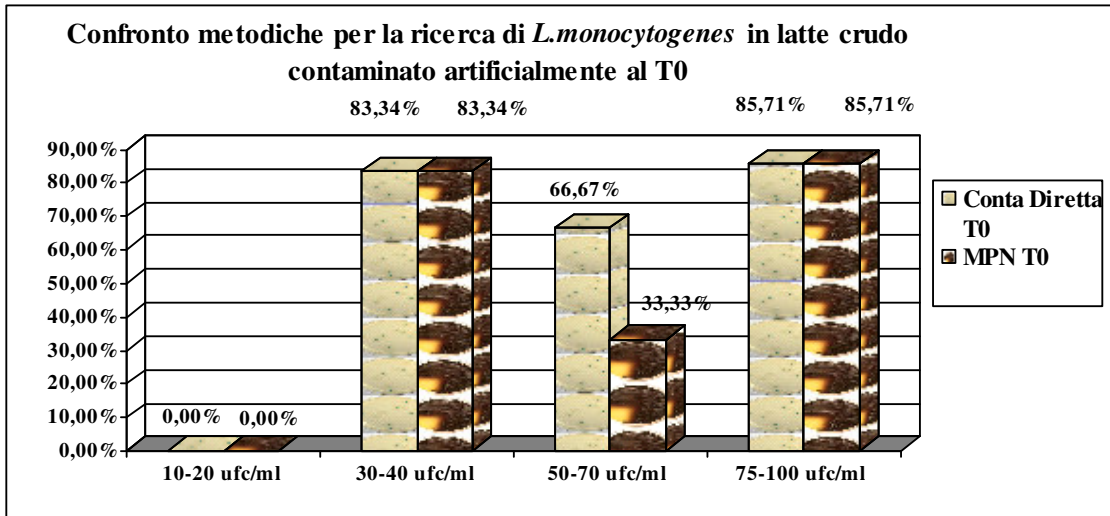


Grafico 33: sensibilità dei due metodi al T0

Come si può osservare dal grafico 33 al T0 e a carichi di 10-20 ufc/ml entrambe le metodiche hanno mostrato una sensibilità pari allo 0%, il carico non è mai stato recuperato. Si può, inoltre, evidenziare che, con inoculi pari a 30-40 e 75-100 ufc/ml, il recupero del carico al T0 è sicuramente elevato e uguale per le due tecniche.

Ad inoculi pari a 50-70 ufc/ml la conta diretta è stata più efficace nel recuperare il carico al T0. Si può quindi affermare che al T0 la sensibilità della conta diretta è più elevata.

Il grafico 34 descrive la capacità di rilevamento delle due metodiche sul latte contaminato artificialmente ai vari tempi di controllo, considerando tutti i campioni insieme e non distinguendo fra i diversi inoculi. Si può, quindi osservare che la conta diretta si è dimostrata più sensibile della metodica MPN al T0 e al T168 e meno sensibile al T48.

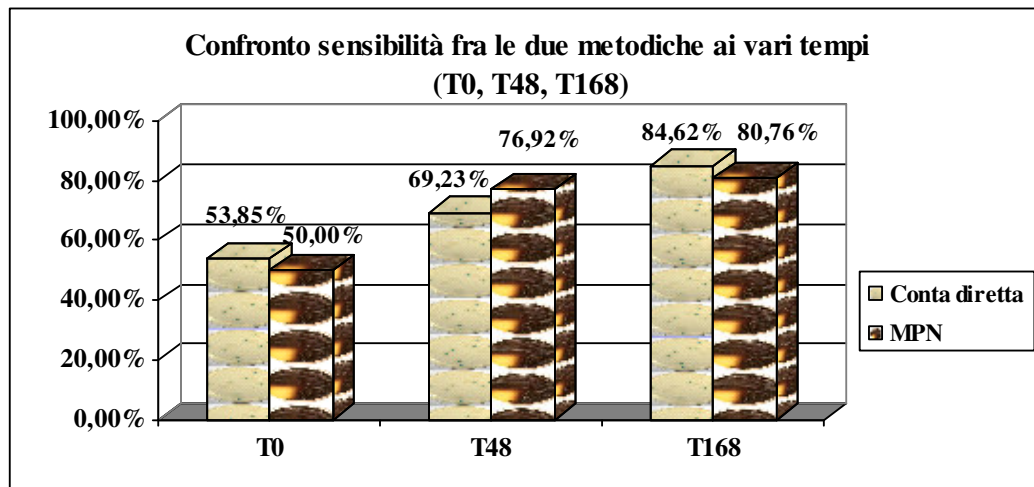


Grafico 34: sensibilità dei due metodi ai vari tempi di controllo considerando tutti i campioni.

Analizzando i dati ottenuti attraverso il protocollo sperimentale mediante l'utilizzo della conta diretta è necessario osservare come il carico limite, fissato dal Reg. n. 2073/2005, pari a 100 ufc/ml, negli alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole per la crescita di *L. monocytogenes*, immessi sui mercati durante il loro periodo di conservabilità, venga superato al T48 da 7 campioni su 26 (26,92%) nella fascia di inoculo che va da 10-75 ufc/ml. In particolare anche nel 28,57% dei campioni contaminati con il carico minimo pari a 10-20 ufc/ml il limite viene superato al T48. Questo prova che, anche partendo da basse contaminazioni, la dose infettante pari a 100 ufc/ml (2 Log ufc/ml) viene raggiunta durante la shelf-life del prodotto.

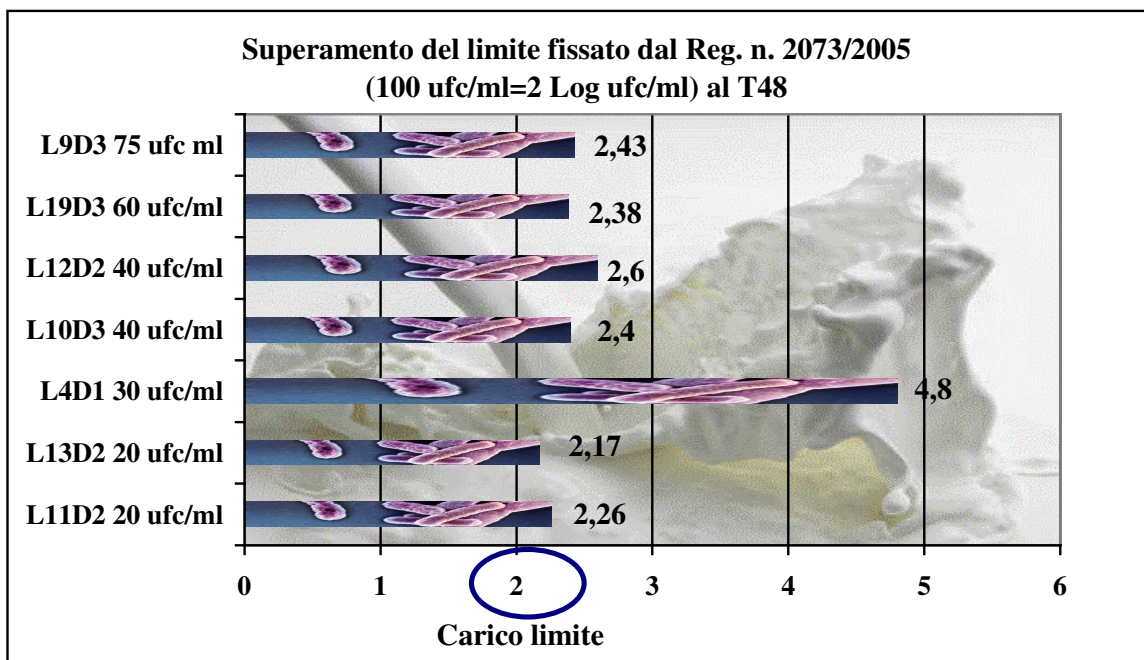


Grafico 35: raggiungimento della dose infettante

Relativamente al carico mesofilo aerobio i grafici sottostanti mostrano il confronto fra i valori medi del carico calcolati ai tempi di controllo previsti (T0, T48, T168), per i diversi distributori (D1, D2, D3), confrontati con i limiti fissati dalle rispettive circolari regionali. Si può evidenziare che il carico microbico mesofilo aerobio del latte crudo, viene sempre superato dal carico del latte prelevato dai distributori monitorati.

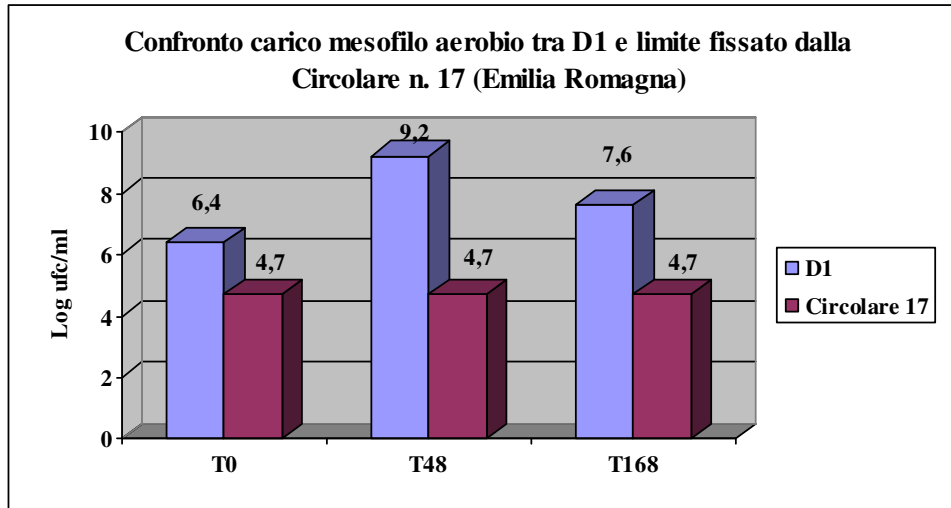


Grafico 36: confronto fra D1 e limite Emilia Romagna (50.000 ufc/ml = 4,7 Log ufc/ml)

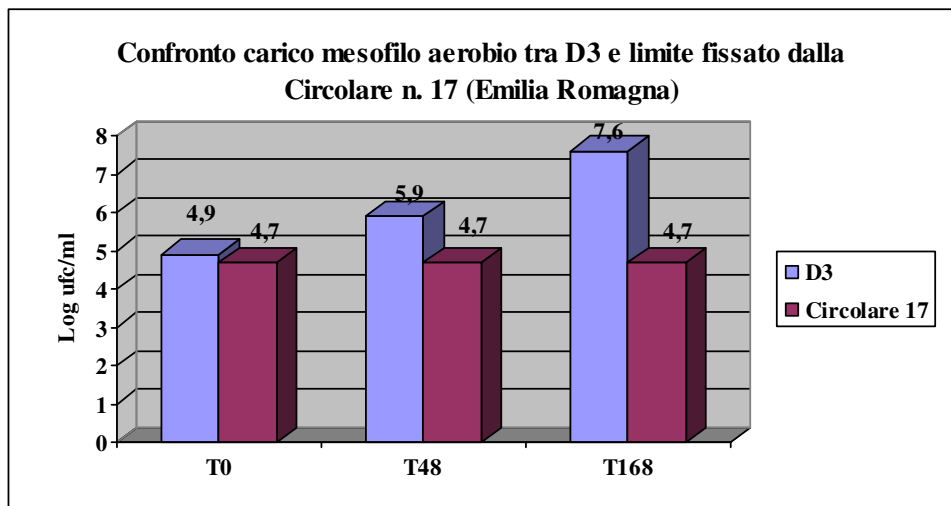


Grafico 37: confronto fra D3 e limite Emilia Romagna (50.000 ufc/ml = 4,7 Log ufc/ml)

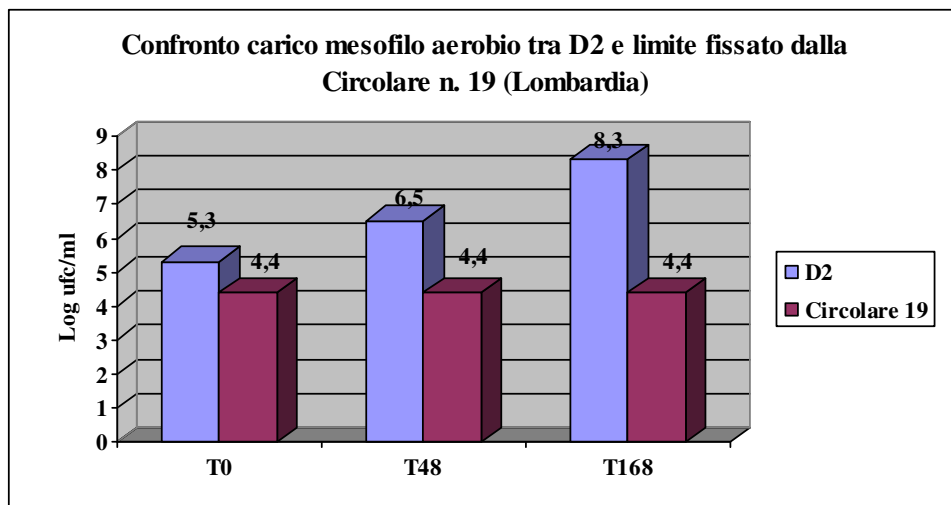


Grafico 38: confronto fra D2 e limite Lombardia (25.000 ufc/ml = 4,4 Log ufc/ml)

E' sicuramente confortante il fatto di aver isolato *L. monocytogenes* in un solo campione al T48, anche se l'elevato tenore del carico mesofilo aerobio riscontrato in tutti i distributori insieme all'alta percentuale di *Listeria* spp sottolineano, le problematiche relative agli aspetti igienici della produzione e della vendita diretta di latte crudo.

Potenzialmente si potrebbe affermare che tutti i prodotti alimentari non sottoposti a trattamento sono più a rischio dei prodotti trattati.

Nello specifico la qualità igienico sanitaria del latte dipende da molteplici fattori:

- stato sanitario delle bovine,
- modalità di mungitura,
- condizioni ambientali;

la mancanza di trattamenti rende sicuramente più precario il raggiungimento costante della qualità. Sono quindi necessarie maggiori cautele allo scopo di mantenere il rischio ad un livello accettabile:

- qualità della materia prima
- buone pratiche di lavorazione
- pulizia di contenitori, erogatori, personale
- rispetto delle temperature
- verifica del rispetto delle procedure
- informazione del consumatore (Sanaa M. *et al.*, 1993)

Sicuramente la normativa nazionale prima del 2008 si è posta come obiettivo la tutela del consumatore, in seguito, però, a diversi episodi di tossinfezione alimentare legati al consumo di questo prodotto, il Ministero della Salute è intervenuto emanando misure urgenti in materia di produzione, commercializzazione e vendita diretta di latte crudo per l'alimentazione umana, attraverso l'ordinanza del 10/12/2008. Essa prevede che tutte le macchine erogatrici espongano in rosso che il latte crudo deve essere consumato previa bollitura e che la data di scadenza non deve superare i tre giorni dalla data di commercializzazione. Quest'obbligo ha sicuramente aumentato la salvaguardia del consumatore, che molto spesso è rimasto disorientato a causa della disputa mediatica sull'argomento, la quale si è dibattuta senza offrire chiarezza tra un "sano" ritorno al passato e l'allarmismo sanitario. E' comunque necessario ricordare che la ricerca spasmodica di prodotti di qualità, privi di processi tecnologici, non sempre è sinonimo di sicurezza.

## 5. Bibliografia

Cappelli P., Vannucchi V. (2000). “Chimica degli alimenti - Conservazione e trasformazioni”. Zanichelli Editore.

Circolare n. 17 (2005), Giunta Regionale-Direzione Generale Sanità e Politiche Sociali. Regione Emilia Romagna. “Linee guida per la vendita diretta al consumatore finale del latte crudo vaccino, ovi-caprino, bufalino e asinino dall’azienda agricola di produzione”.

Circolare n. 19 (2007), Giunta Regionale-Direzione Generale Sanità. Regione Lombardia. OGGETTO: Circolare 13/SAN del 13 aprile 2007 “Vendita diretta al consumatore di latte crudo vaccino, ovi-caprini e bufalini nell’azienda agricola di produzione – Modifiche e integrazioni alle Circolari n.39/SAN del 17 novembre 2004 e n.20/SAN del 24 maggio 2005” - Precisazioni.

De Valk H., Jacquet C., Goulet V., Vaillant V., Perra A., Simon F., Desenclos JC., Martin P (2005). “Surveillance of *Listeria* infections in Europe”, *Eurosurveillance*, Volume 10, Issue 10, 01.

Doganay M. (2003). “Listeriosis: clinical presentation”. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35, 173-175.

Dussurget O., Pizzarro-Cerda J., Cossart P. (2004). “Molecular Determinants of *Listeria monocytogenes* virulence”. *Annual Review of Microbiology*, 2004, 58, 587-610”

EFSA “ Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and related risk for human illness” . Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. (Question No EFSA-Q-2007-064). Adopted on 6 December 2007. *The EFSA Journal* (2007) 599, 1-42.

EFSA “Proposed tecnica specifications for a survey on *Listeria monocytogenes* in selected categories of ready-to-eat food at retail in the EU”. Report of Task Force on Zoonoses Data Collection. (Question N°EFSA-Q-2008-415). Adopted on 22 May 2009. *The EFSA Journal* (2009) 300, 1-66.

Farber J. M., Peterkin P. I. (1991). “*Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen”. *Microbiol. Rev.* 55:476.

Fernandez-Garayzabal J. F., Dominiguez L., Vazquez A., Gomez-Lucia E., Rodriguez-Ferri E. R., Suarez G. (1987). “Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk”. *Vet. Rec.* 107:390.

Galli Volontario A. (2005). *Microbiologia degli alimenti*, CEA.

Gray M. J., Zadoks R. N., Fortes E. D., Dogan B., Cai S., Chen Y., Scott V. N., Gombas D. E., Boor K. J., Wiedmann M. (2004). “*Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans from distinct but overlapping populations”, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5833-5841.

Hain T, Chatterjee SS, Ghai R, Kuenne CT, Billion A, Steinweg C, Domann E, Kärst U, Jänsch L, Wehland J, Eisenreich W, Bacher A, Joseph B, Schär J, Kreft J, Klumpp J, Loessner MJ, Dorscht J, Neuhaus K, Fuchs TM, Scherer S, Doumith M, Jacquet C, Martin P, Cossart P, Rusniok C, Glaser P, Buchrieser C, Goebel W, Chakraborty T. (2007). "Pathogenomics of *Listeria* spp.", *International Journal of Medical Microbiology*, 297,541-557.

<http://nrc-cnrc.gc.ca>

<http://www.beppegrillo.it>

<http://www.cdc.gov/foodnet/reports.htm>

<http://www.ecoliblog.com/rawmilk>

<http://www.ecoliblog.com/rawmilk>

<http://www.epicentro.iss.it>

<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=572>

<http://www.medicinalive.com>

<http://www.milkmaps.com>

<http://www.ministerosalute.it/malattieInfettive/paginaInternaMenuMalattieInfettive.jsp?id=812&menu=strumentieservizi>

<http://www.scienceblogs.com>

<http://www.who.int>

La Placa, *Listeria monocytogenes*, in *Principi di Microbiologia medica – Ottava Edizione*, Società Editrice Esculapio, Bologna, 2000.

Landini M. P. (2009). "Attenzione al latte crudo. I rischi infettivi impongono prudenza". *Elisir di salute, il punto di vista di medici e ricercatori*, maggio/giugno 2009.

Liu D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55,645-659.

Lovett J., Francis D. W., Hunt J. M. (1987). "*Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity". *Journal of Food Protection* 50:188.

Meldolesi A. (2008). "Latte crudo, la moda porta in ospedale". *Il Riformista Nord*, 3 dicembre 2008)

Mims C., Dockrell H. M., Goering R. V., Roitt I., Wakelin D., Zuckerman M. (2006). "Infezioni del tratto gastroenterico". In Microbiologia clinica. Mims C., Dockrell H. M., Goering R. V., Roitt I., Wakelin D., Zuckerman M. (Eds.). EMSI, Roma, 306.

Norma ISO 11290-1 e 2: 2005 "Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*".

Norma ISO 4833: 2004 "Horizontal method for the enumeration of microorganisms- Colony-count technique at 30 degrees C".

Ordinanza del 10 dicembre 2008, Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali. "Misure urgenti in materia di produzione, commercializzazione e vendita diretta di latte crudo per l'alimentazione umana".

Ramaswamy V., Cresence V. M., Rejitha J., Mohandas U. L., Dharsana K. S., Suryaprasad P. P., Helan M. V. (2007). *Listeria*: Review of epidemiology and pathogenesis. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 40,4-13.

Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.

Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004) che stabilisce le norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.

Sanaa M., Poutrel B., Menard J.L., Serieys F. (1993). "Risk Factors Associated with Contamination of Raw Milk by *Listeria monocytogenes* in Dairy Farms". Journal of Dairy Science, Vol. 76, No. 10, 1993.

Scott E. Martin and Christopher W. Fisher, *Listeria monocytogenes*, Department of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois, Urbana, Usa. Tratto da Enciclopedia of Food Microbiology edited by Richard K. Robinson, Carl A. Batt, Pradip D. Patel, volume two, Academic Press, 2000.

Sicheri G. (1994). "Industrie agrarie e agroalimentari". Editore Ulrico Hoepli Milano.

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

Vazquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal, Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J., Kreft J. (2001). "Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants". Clinical Microbiology Reviews, 2001, Vol.14, No. 3, 584-640.

Wiedmann M., Bruce J. L., Keating C., Johnson A. E., McDonough P. L., Batt C. A. (1997). "Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential", Infection and Immunity, 65, 2707-2716.

## Ringraziamenti

I ringraziamenti non sono un obbligo ma doverosi se veramente sentiti.

Per questo motivo la ringrazio Prof. per avermi dato la possibilità di crescere professionalmente e per essere stato veramente tanto disponibile in un momento di grande difficoltà personale e familiare.

Caro Prof. ho riconosciuto in lei una persona per la quale nutrire un profondo rispetto.

Ringrazio te, Cri, perché spesso ho incontrato il tuo sorriso e la tua complicità, ho sentito di essere una delle “tue ragazze”.

Ringrazio te, Silvia, per la reciproca comprensione dei problemi di noi mamme e per aver capito la mia passione per la vita di laboratorio.

E ora a voi, mie care colleghe/i.

Ari, mia suffragetta, sognatrice e viaggiatrice incallita, sensibile e fragile quanto forte e determinata, non abbiamo condiviso solo il lavoro ma anche e soprattutto diverse esperienze di vita, spero che la lontananza non interrompa il nostro viaggio.

Alle, ostinatamente ottimista, folle e geniale, nonostante le nostre vite si siano solo incrociate per poco, mi sei rimasta nel cuore.

Fede, realistica e pragmatica, 100% energia allo stato puro. Non dimenticherò le nostre corse in bicicletta, in molti momenti ti ho sentita vicina a me e al mio modo di essere e di pensare. Ora stai diventando una mamma anche tu, sei nata per essere mamma per il tuo profondo senso di responsabilità, avremo ancora molto da condividere.

Elena, dolce e istintiva piccola stella, hai portato la freschezza. Grazie per esserti sempre preoccupata dei miei problemi, non conosci l'indifferenza verso le persone ed è un sentimento bellissimo. Ti auguro un percorso pieno di stimoli.

Luca, riflessivo e riservato, ho ammirato la tua curiosità scientifica e le tue capacità. Abbiamo invaso spesso, scherzosamente, i tuoi spazi, spero che questi momenti ti abbiano alleggerito le giornate in mezzo a tante donne.

Pina, un uragano di simpatia, vedi sempre le nostre preoccupazioni, le nostre tristezze e riesci ad allontanarle. Ti ringrazio per essermi stata sempre vicino.

Ida, sempre disponibile all'aiuto, grazie per aver compreso i tanti momenti di agitazione.

E ora alla mia famiglia.

Mamma e papà siete un esempio e una luce sempre presente. Avete dedicato la vostra vita a me e ora anche a Riccardo e a Italo, a quella che è diventata la mia famiglia, non trovo davvero le parole per ringraziarvi.

Italo, sono cresciuta insieme a te e sei diventato mio marito, in questi ultimi anni abbiamo condiviso tante nuove emozioni, Riccardo, la casa, e ora un nuovo bimbo/a in arrivo, non ci sono mancate difficoltà e sofferenze e per quanto riguarda i problemi, ne abbiamo e ne avremo. La vita ci sta, semplicemente travolgendo ma grazie a te e ai nostri bimbi sono la persona più felice del mondo.

Elisa