



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotechnologie "L. Spallanzani"

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Gestione dei casi di MTA (Malattie a Trasmissione
Alimentare) in Toscana.

Le attività del Centro Regionale di Riferimento di Pisa per
Listeria monocytogenes

Relatrice:

Prof.ssa De Rossi Edda

Correlatrici:

Dott.ssa Gasperetti Laura

Dott.ssa Campeis Francesca

Tesi Sperimentale di

Giorgia Licata

Anno Accademico 2025/2026

1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 Malattie a Trasmissione Alimentare (MTA) e la loro gestione nella Regione Toscana	5
1.2 Centro di Riferimento Regionale per <i>Listeria monocytogenes</i>	10
1.2.1 Istituzione del CRRLm	10
1.2.2 Ruolo del CRRLm nei casi di MTA	10
1.2.3 Attività analitiche svolte presso il CRRLm	11
1.2.4 Gestione ceppi di <i>L. monocytogenes</i> al CRRLm.....	13
1.2.5 Gestione dei dati di <i>L. monocytogenes</i> in piattaforme informatiche	14
Piattaforma Seap	14
Piattaforma GenPat	15
Piattaforma IRIDA-ARIES	17
1.2.6 Gestione dei ceppi di <i>Salmonella</i> al CRRLm	18
1.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	20
1.3.1 Cenni storici	20
1.3.2 Generalità.....	21
1.3.3 Epidemiologia	21
1.3.4 Incidenza	22
1.3.5 Listeriosi negli animali e nell'uomo	24
1.3.6 Invasività e fattori di virulenza	25
1.4 <i>Salmonella</i>	28
1.4.1 Generalità microbiologiche.....	28
1.4.2 Tassonomia	29
1.4.3 Formula antigenica	29
1.4.4 Salmonellosi nell'uomo	30
1.5 Risvolti legislativi	31
1.5.1 Prevenzione per la Listeriosi.....	31
Regolamento 2073 e successive modifiche	31
Regolamento 2895/2024	33
Regolamento 2463/2024	34
1.5.2 Sorveglianza della Listeriosi nell'uomo	36
Regolamento 179/2025	37
2. SCOPO DEL LAVORO	39
3. MATERIALI E METODI.....	41
3.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	41
3.1.1 Norma tecnica UNI EN ISO 11290-1	42
3.1.2 UNI EN ISO 11290-2	45
Test di conferma per definire il genere e la specie	47
3.1.3 Sierotipizzazione sierologica	50
3.1.4 Sierotipizzazione molecolare	54
Estrazione del DNA	55

Amplificazione mediante PCR	55
Esecuzione ed interpretazione dei risultati tramite elettroforesi	57
3.1.5 Sequenziamento WGS	59
Estrazione del DNA	60
Preparazione delle librerie genomiche	61
MiSeq Illumina	63
Quality check (QC) dei dati prodotti dal sequenziatore	63
Analisi bioinformatiche dei dati: trimming delle sequenze grezze, assemblaggio de novo e QC dell'assemblaggio	64
3.1.6 Analisi bioinformatica sulle sequenze genomiche finite	64
3.2 Salmonella spp.	65
3.2.1 sieroagglutinazione antigene somatico O	65
3.2.2 Tipizzazione molecolare	66
3.3 Campylobacter spp.	67
3.3.1 Caratterizzazione molecolare di specie	68
Estrazione del DNA	69
Amplificazione mediante PCR	69
Analisi elettroforetica	69
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	72
4.1 Listeria monocytogenes	72
4.1.1 Analisi di prevalenza	72
4.1.2 Analisi bioinformatiche con funzione “ReportTree”	75
4.2 Salmonella	79
4.2.1 Analisi di prevalenza	79
5. CONCLUSIONI	83
BIBLIOGRAFIA	84

1. INTRODUZIONE

1.1 Malattie a Trasmissione Alimentare (MTA) e la loro gestione nella Regione Toscana

Con il termine Malattie trasmesse da alimenti si fa riferimento a Malattie di natura infettiva o tossica causate, o che si suppone siano state causate, da consumo di cibo o acqua. Queste possono essere classificate in:

- Infezioni alimentari: malattie provocate dall'ingestione di agenti patogeni vivi con successiva invasione e moltiplicazione degli stessi all'interno della mucosa intestinale o altri tessuti (es. *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp.).
- Tossinfezioni alimentari: malattie dovute a tossine prodotte da microrganismi patogeni all'interno del tratto gastrointestinale (es. malattie da *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *Vibrio cholerae*).
- Intossicazioni alimentari: malattie dovute all'ingestione di sostanze tossiche (prodotti chimici) o tossine prodotte dagli organismi nell'alimento ed ingerite con l'alimento stesso senza che necessariamente venga ingerito anche l'agente patogeno (es. tossina di *Staphylococcus aureus*, di *Clostridium botulinum* e di *Bacillus cereus*, intossicazioni da funghi, sindrome sgombroide, intossicazione da metalli pesanti, etc.).

Per la definizione di caso di ciascuna MTA ad eziologia di natura infettiva, vengono valutati specifici criteri che sono riportati nel documento “Decisione di Esecuzione (UE) 2018/945 della Commissione del 22 giugno 2018, relativa alle malattie trasmissibili e ai problemi sanitari speciali connessi da incorporare nella sorveglianza epidemiologica, nonché alle pertinenti definizioni di caso”, elencati di seguito.

- Criteri clinici: comprendono i segni e i sintomi comuni e rilevanti che singolarmente o in associazione costituiscono un quadro clinico chiaro o indicativo della malattia.
- Criteri di laboratorio: consistono in un elenco di metodi di laboratorio utilizzati a conferma di un caso. Solitamente un solo test fra quelli compresi nell'elenco è sufficiente a confermare il caso.
- Criteri epidemiologici: si considerano soddisfatti quando è possibile stabilire una correlazione epidemiologica.

Per “correlazione epidemiologica”, durante il periodo di incubazione, si intende una delle sei forme seguenti:

- trasmissione interumana;
- trasmissione da animale a uomo;
- esposizione a una fonte comune;
- esposizione ad alimenti o ad acqua da bere contaminati;
- esposizione ambientale;
- esposizione in laboratorio.

Ai fini della sorveglianza i casi sono classificati come possibile, probabile o confermato. Nello specifico:

- ☐ caso possibile. È un caso che soddisfa i criteri clinici descritti nella definizione ma per il quale non esistono prove epidemiologiche o di laboratorio della malattia in questione. La definizione di un caso possibile è molto sensibile e poco specifica. Permette di individuare la maggior parte dei casi, ma in tale categoria saranno inclusi anche alcuni falsi positivi.
- ☐ caso probabile. Quando sono soddisfatti i criteri clinici ed è presente una correlazione epidemiologica come descritto nella definizione del caso.
- ☐ caso confermato. Rappresentato da soddisfatti criteri di laboratorio per caso confermato e non devono necessariamente essere soddisfatti i criteri clinici descritti nella definizione del caso. La definizione di un caso confermato è altamente specifica e meno sensibile e prevede una suddivisione in tre sottocategorie:
 - Caso confermato in laboratorio e con criteri clinici, quando il caso soddisfa i criteri di laboratorio per la conferma del caso e i criteri clinici compresi nella definizione del caso.
 - Caso confermato in laboratorio e con criteri clinici ignoti, se il caso soddisfa i criteri di laboratorio per la conferma del caso ma mancano informazioni relative ai criteri clinici (ad esempio è disponibile solo il rapporto di laboratorio).
 - Caso confermato in laboratorio e senza criteri clinici, se il caso soddisfa i criteri di laboratorio per la conferma del caso ma non soddisfa i criteri clinici compresi nella definizione del caso o è asintomatico (European Commission, 2018).

Nel dicembre del 2015, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha pubblicato il rapporto "WHO estimates of the global burden of foodborne diseases", che ha stimato 600 milioni di casi e 420.000 decessi correlati a malattie veicolate da alimenti nel 2010. I bambini di età inferiore ai 5 anni sono particolarmente a rischio, con 125.000 decessi all'anno. Per questo la prevenzione e il controllo delle malattie trasmesse da alimenti (MTA) sono attività di grande rilevanza per la tutela della salute dei consumatori.

A supporto dell'importanza di disporre di dati aggiornati e accurati per orientare le politiche di sicurezza alimentare, il rapporto annuale sulle zoonosi pubblicato nel 2024 dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) evidenzia che, nel 2023, la campilobatteriosi è risultata essere l'infezione gastrointestinale di origine alimentare più frequentemente segnalata nell'Unione Europea, seguita dalla salmonellosi. Inoltre, 27 Stati membri hanno riportato 2.952 casi confermati di infezione da *L. monocytogenes*, pari a un tasso di notifica di 0,66 casi ogni 100.000 abitanti. Tale valore rappresenta un incremento del 5,8% rispetto al 2022 (0,63/100.000) e costituisce il tasso più elevato registrato dal 2007 (EFSA & ECDC, 2024).

Anche se il carico delle MTA non è distribuito equamente in tutto il Mondo, rappresenta ancora oggi, anche nei paesi industrializzati, un importante problema di sanità pubblica. Una rigorosa sorveglianza è quindi fondamentale per garantire un sistema internazionale di controllo della sicurezza alimentare.

Per garantire un'efficace prevenzione e gestione di questi episodi, è fondamentale disporre di informazioni precise sulla loro reale diffusione nel territorio regionale [36].

Con l'emanazione della direttiva 2003/99CE, relativa alle zoonosi e i rispettivi agenti zoonotici da sottoporre a sorveglianza a tutela della salute umana, nell'allegato I parte A vengono inseriti la Listeriosi e *L. monocytogenes*. Da ciò ne deriva che ciascun Stato membro deve notificare all'EFSA numerose informazioni associate ai casi manifestatosi nell'uomo, compreso il numero di focolai, ma anche dati inerenti a mangimi, animali e ambiente [37]. La necessità di tali misure emerge dall'analisi dei dati dei casi notificati di MTA nei Paesi dell'Unione. Infatti, nonostante i numeri siano nettamente inferiori a campylobatteriosi e salmonellosi, risultano preoccupanti le alte percentuali di ospedalizzazione e mortalità, che risultano essere le più alte a confronto con le altre infezioni zoonotiche.

Quando si verifica un caso di Listeriosi nell'uomo, o più in generale di infezione/tossinfezione/intossicazione alimentare, risulta fondamentale l'esecuzione

tempestiva di attività analitiche laboratoriali per l'individuazione e la caratterizzazione molecolare dell'agente eziologico e dell'alimento contaminato. Tale scopo è realizzato attraverso la cooperazione lavorativa di diverse strutture, tra cui:

- Laboratori clinici ospedalieri che isolano il patogeno da campioni-clinici (feci, sangue, liquor).
- Laboratorio Alimenti IZS e LPS (Laboratorio di Sanità Pubblica) che ricercano il microrganismo responsabile nel prodotto alimentare.

CRRLm: la Regione Toscana per ottimizzare la gestione di casi di MTA, soprattutto dei casi di Listeriosi, ha istituito il Centro Regionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes* (C.R.R.L.m.) che svolge numerose attività a supporto. Il CRRL, infatti, tra le varie mansioni si occupa di verificare la correlazione tra la patologia e l'alimento sospetto, attraverso indagini molecolari eseguite sui patogeni isolati dai campioni clinici e dagli alimenti.

Per poter assolvere allo scopo definito precedentemente, è necessaria una ottimale gestione dell'episodio di MTA. Nella regione Toscana ha inizio con la notifica all'ASL-Servizio Igiene e Sanità Pubblica dell'episodio clinico sospetto (Figura 1) che può essere effettuata da un qualsiasi medico, privato o ospedaliero. È prevista la compilazione del questionario relativo ai casi di Listeriosi. La segnalazione viene inoltrata anche alla regione Toscana, al Ministero della Salute e al Ce.R.R.T.A (Centro di Riferimento Regionale sulle Tossinfezioni Alimentari). La ASL prende contatto col CRRLm per l'invio degli isolati umani e/o veterinari e dei campioni alimentari sospetti per la ricerca del microrganismo interessato. Al centro vengono eseguite le attività analitiche previste per gli specifici microrganismi, ma può anche usufruire delle competenze di altre strutture IZSLT, come il CREP (Centro di Riferimento Regionale per gli Enteropatogeni), attraverso l'invio degli isolati. Tutte le informazioni, compresi i dati ottenuti dalle prove, vengono condivisi col Ce.R.R.T.A.

In accordo col regolamento di esecuzione (UE) 2025/179 della Commissione i ceppi di *Salmonella enterica*, *L. monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* isolati da alimenti, animali, mangimi sospetti o dall'ambiente (nel caso cui si sospetta una correlazione con focolai tossinfettivi alimentari) devono essere sottoposti a sequenziamento dell'intero genoma (Whole Genome Sequencing, WGS) [40].

Flusso di gestione delle malattie a trasmissione alimentare nella Toscana

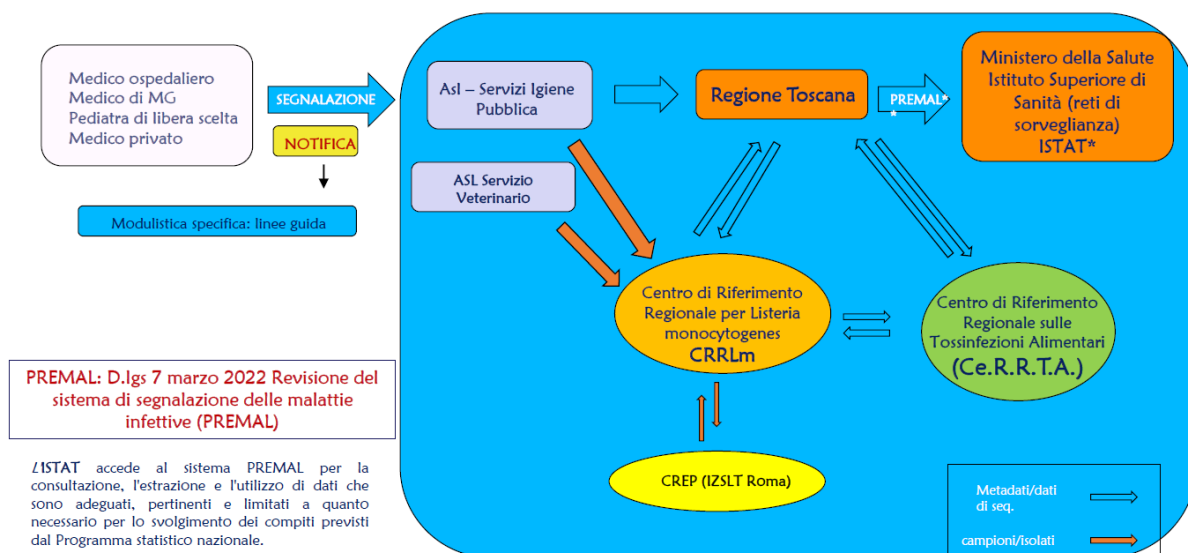


Figura 1- Flusso di gestione delle malattie a trasmissione alimentare in Toscana [26].

Le sequenze e i dati/metadati correlati vengono successivamente caricati su piattaforme informatiche (Tabella 1).

Isolati	Piattaforma
<i>Listeria monocytogenes</i>	SEAP/GenPat
<i>Campylobacter jejuni e coli</i>	SEAP/GenPat
<i>Escherichia coli</i>	IRIDA-ARIES
<i>Salmonella spp</i>	ENTERVET

Tabella 1- Piattaforme informatiche di caricamento dati specifiche per i diversi microrganismi.

In conformità al regolamento UE 179/2025, i risultati del WGS sugli isolati degli agenti patogeni identificati, trasmessi ad EFSA, saranno confrontati con i risultati del WGS sugli isolati umani comunicati all'ECDC.

1.2 Centro di Riferimento Regionale per *Listeria monocytogenes*

1.2.1 Istituzione del CRRLm

La Sezione Pisa, oggi Unità Operativa Complessa Toscana Nord (UOC TN), è stata istituita nel 1951 e ad oggi garantisce il servizio zooprofilattico nelle province di Livorno, Lucca, Pisa e Massa Carrara. È riconosciuto, anche, come laboratorio di riferimento per il PCF (Posti di Controllo Frontalieri) di Livorno [38]. Con la delibera numero 734 del 27 giugno 2022, la Giunta regionale ha individuato presso la UOC TN dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale

delle Regioni Lazio e Toscana “M. Aleandri” il CRRLm [39] e nel corso della sua attività ha svolto progressivamente la sua funzione anche per le altre MTA, come *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* patogeni, *Vibrio* patogeni, ecc. nell'ambito della propria Regione di competenza.

1.2.2 Ruolo del CRRLm nei casi di MTA

Nel contesto della gestione dei casi di MTA offre il suo servizio a tutela della salute umana attraverso:

- Esecuzione di attività analitiche nell’ambito di un sistema regionale di sorveglianza molecolare delle infezioni umane causate da *L. monocytogenes* e da altri enterobatteri patogeni per l’uomo avvalendosi delle competenze specialistiche anche di altre strutture della Sede centrale IZSLT;
- Gestione della documentazione di accompagnamento, nel rispetto delle norme sul trattamento dei dati;
- Alimentando le piattaforme informatiche dell’ISS (IRIDA ARIES) per ceppi umani di *L. monocytogenes* ed *E. coli* STEC e del LNR IZSAM di Teramo per i ceppi alimentari, animali e ambientali (SEAP-GenPat);
- Restituendo informazioni all’autorità sanitaria regionale ed alle strutture sanitarie del territorio;
- Contribuendo alle indagini epidemiologiche svolte in ambito regionale e nazionale per la sorveglianza sanitaria delle infezioni umane da *L. monocytogenes* e degli altri patogeni a trasmissione alimentare;
- Stilando insieme al CREP/LRMTA/LRPTAU un’attività di reportistica focalizzata sui patogeni di origine umana e veterinaria (*L. monocytogenes*, *Campylobacter*, *E. coli* patogeni, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella*, *S. aureus*, *V. cholerae*);
- Partecipando alla rete di sorveglianza ENTER NET con la sierotipizzazione degli isolati umani provenienti da strutture sanitarie pubbliche e laboratori di analisi privati della Toscana.

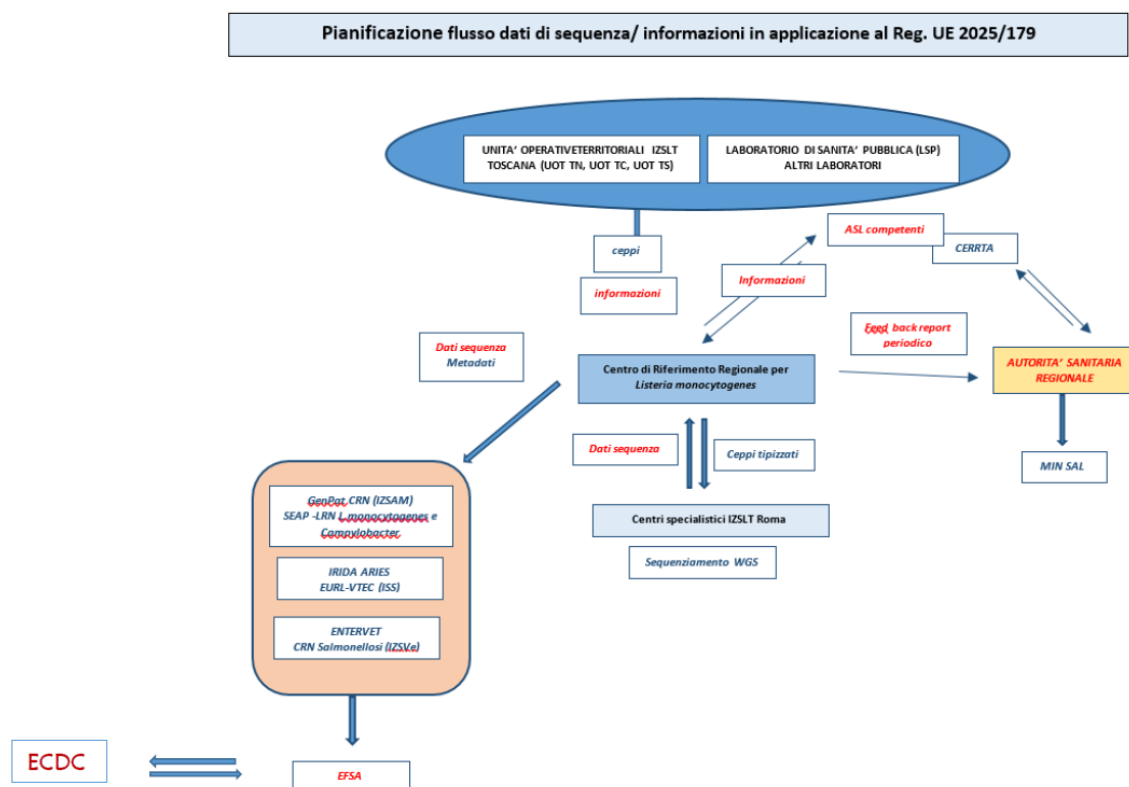


Figura 2 - Schema del flusso dei dati in conformità al Regolamento UE 2025/179 [26].

1.2.3 Attività analitiche svolte presso il CRRLm

Il centro gestisce i seguenti ceppi batterici:

- *Salmonella* spp.;
- *E. coli* enteropatogeni;
- *Vibrio* spp.;
- *L. monocytogenes*;
- *Campylobacter*;
- *Y. enterocolitica*;
- *Shigella* spp.;
- *C. perfringens*;
- *B. cereus*;
- *Staphylococcus*.

Questi possono avere origine:

- umana: da presidi ospedalieri, policlinici universitari della Regione Toscana e laboratori privati nell'ambito regionale di competenza;
- alimentare: isolati nei laboratori delle sedi territoriali dell'IZSLT, in ambito di controllo ufficiale (PRA, PNAA, UVAC, PIF e MTA) o autocontrollo, laboratori di sanità pubblica e laboratori privati operanti nel settore delle produzioni alimentari;
- animale: isolati nei laboratori di diagnostica generale delle sedi territoriali dell'IZSLT;
- ambientale: da controllo ufficiale nell'ambito delle verifiche di sanificazione delle aree di produzione alimentare e macellazione, da indagini in casi di MTA, da autocontrollo, da isolamenti effettuati nel settore ambientale da laboratori Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale e laboratori privati.

I ceppi, una volta ricevuti dalla struttura, vengono prima sottoposti a colture in purezza e successivamente si sfruttano metodiche sierologiche (con l'esecuzione di test di agglutinazione) e molecolare (come multiplex PCR e PCR Real-Time) per la loro caratterizzazione. Nello specifico, sono elencate di seguito le prove effettuate sui ceppi batterici gestiti al Centro:

- *L. monocytogenes*: Sierotipizzazione sierologica e molecolare (PCR multiplex);
- *Salmonella* spp: Tipizzazione sierologica e molecolare (PCR multiplex);
- *Y. enterocolitica*: Tipizzazione molecolare (PCR Real-Time);
- *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*: Tipizzazione di specie molecolare (PCR multiplex);
- *E. coli* enteropatogeni (EAEC, ETEC, EIEC, STEC, EPEC): Tipizzazione molecolare di gruppo, tipizzazione delle verocitotossine, altri fattori di patogenicità (PCR Real-Time e PCR multiplex);
- *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus*: Tipizzazione sierologica/ Identificazione molecolare di specie, geni di patogenicità (PCR Real-Time).

Può essere eseguita una identificazione di specie batteriche attraverso il sequenziamento Sanger del gene r-RNA 16S per Enterobatteri patogeni veterinari, se necessario.

1.2.4 Gestione ceppi di *L. monocytogenes* al CRRLm

I ceppi di *L. monocytogenes* umani o veterinari (isolati di origine animale, ambientale e alimentare) che vengono inviati al CRRLm devono essere in primo luogo accettati dalla struttura, per cui la corrispettiva documentazione viene registrata su SIL (Sistema Informativo Laboratori). Dopo il caricamento informatico delle prove si eseguono la sieroagglutinazione

degli antigeni somatici e flagellari per risalire al sierotipo, e una "multiplex PCR end-point" per definirne il sierogruppo, metodo considerato ad oggi il "gold standard". Una volta caratterizzati, i ceppi vengono inviati al CREP, il quale a sua volta procederà con il sequenziamento WGS. Le sequenze sono necessarie per approfondire studi epidemiologici o in caso di focolaio epidemico. I ceppi umani saranno inviati all'Istituto Superiore di Sanità (ISS) mentre i ceppi veterinari al LNR Listeria con frequenza trimestrale.

Il CRRLm svolge attività di conservazione dei ceppi sfruttando il sistema Microbank (Figura 3), costituendo così una ceppoteca di tutti gli isolati di *L. monocytogenes* che vengono inviati ed analizzati al Centro.

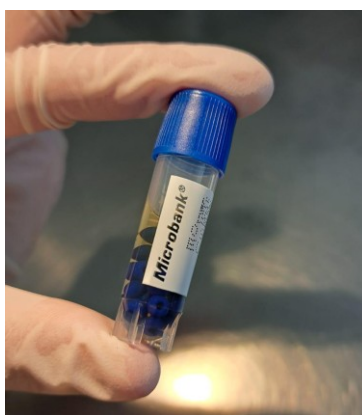


Figura 3 - Provetta Microbank contenente 25 sfere porose immerse.

Al termine delle prove i risultati ottenuti dalla tipizzazione e dal sequenziamento degli isolati di *L. monocytogenes* ed i relativi dati del campione vengono inseriti sulle rispettive piattaforme informatiche (IRIDA-Aries e SEAP) per le attività di sorveglianza. IRIDA IRIES è una piattaforma bioinformatica gestita dall'ISS che restituisce i metadati risultanti dal sequenziamento NGS.

Per i ceppi di origine alimentare/animale/ambientale viene aggiornato il sistema informativo SEAP gestito dal laboratorio Nazionale di Riferimento per *L. monocytogenes* con sede presso l'IZS di Teramo.

I dati di sequenza degli isolati di origine veterinaria di *L. monocytogenes* vengono caricati su piattaforma GenPat gestita dal CRN per le sequenze genomiche di microrganismi patogeni presso IZS Teramo.

1.2.5 Gestione dei dati di *L. monocytogenes* in piattaforme informatiche

Piattaforma Seap

Il sistema informativo SEAP (Sistema di Sorveglianza Epidemiologica per Agenti Patogeni Alimentari) (Figura 4) fornisce diversi servizi finalizzati al supporto delle attività di sorveglianza epidemiologica degli agenti patogeni associati a patologie di origine alimentare. In particolare, fornisce supporto alle attività dei Laboratori Nazionali di Riferimento per *L. monocytogenes* e *Campylobacter* spp (LNR), soprattutto per quanto riguarda la gestione on line delle informazioni associate ai ceppi di agenti patogeni che possono essere alla base di tossinfezioni alimentari, isolati sul territorio nazionale da campioni ambientali, animali, di alimenti e mangimi. L'obiettivo finale è raccogliere informazioni epidemiologiche sui ceppi di *Listeria monocytogenes* circolanti sul territorio nazionale e confrontarle con quelle relative ai ceppi isolati in altri Paesi.

Dalla schermata HOME del portale, il CRRLm, autorizzato a livello regionale, può accedere attraverso le credenziali e caricare nella piattaforma i dati associati ai ceppi di *L. monocytogenes* analizzati relativi a prelievo del campione, matrice esaminata, ecc, i risultati delle prove relative a identificazione e caratterizzazione del microrganismo e le corrispondenti sequenze genomiche se disponibili, altrimenti può inviare direttamente il ceppo coi metadati associati.



Figura 4 - Schermata di accesso al portale di sorveglianza SEAP.

Un esempio di compilazione delle informazioni è mostrato in Figura 5, dove è possibile visualizzare le categorie da compilare in riferimento alla matrice alimentare contaminata. Sono

obbligatorie solo le informazioni evidenziate in rosso, ma in genere più ne vengono fornite e più precise sono le indagini che possono essere eseguite quando si analizzano i dati.

Matrice:

Specie:

Motivo del Prelievo:

Tipo di Campione:

Origine materie prime del prodotto:

Note:

Origine del prodotto(per gli alimenti prelevati in punto diverso dal luogo di produzione)

Ragione Sociale Produttore:

Indirizzo Produttore:

Stato:

Comune:

Codice azienda d'origine dell'animale: **N. stabilimento di macellazione:**

N. stabilimento di lavorazione:

Confezionamento:

Modalità di consumo

Tipo:

Data: ☐ (scadenza o termine minimo di conservazione)

Figura 5 - Rappresentazione della sezione del portale dedicata al caricamento dei dati del campione.

Il SEAP consente anche di visualizzare i report relativi ai risultati complessivi ottenuti dall'analisi dei dati raccolti sul territorio nazionale, pubblicati periodicamente e messi a disposizione di tutti gli utenti dell'amministrazione del sistema IZSAM [31].

Piattaforma GenPat

Il Ministero della Salute, con Decreto del 30 maggio 2017, ha attivato il Centro di Referenza Nazionale per Sequenze Genomiche di microrganismi patogeni: banca dati e analisi di bioinformatica - CRN GENPAT - presso la sede centrale dell'IZS dell'Abruzzo e del Molise.

Il CRN ha realizzato la piattaforma nazionale per la raccolta e conservazione delle sequenze genomiche dei microrganismi patogeni (GENPAT) per l'esecuzione delle analisi bioinformatiche, l'archiviazione e la condivisione dei risultati.

Nel caso specifico degli isolati veterinari di *L. monocytogenes* è la sede di Teramo che si occupa del caricamento delle sequenze con l'inserimento di metadati associati. Tra quelli obbligatori:

- codice identificativo del campione nel sistema del data provider;
- la specie del patogeno;
- il materiale del campione;

- luogo di prelievo;
- data di prelievo;
- matrice di isolamento.

Il CRRLm utilizza le sequenze dei microrganismi inserite nel database per verificare la presenza di una correlazione tra gli isolati patogeni.

La selezione dei ceppi da sottoporre all'analisi bioinformatica su piattaforma viene realizzata confrontando i parametri di screening Clonal Complex (CC) e Sequence Type (ST) presenti nelle colonne riportanti i metadati associati ai campioni (Figura 6).

Codice interno	Specie	Ospite	Matrice	Data pr...	Complesso Clon...	Sequence Type	Richiedente	Tipologia campione	Controllo
	Listeria monocytogen...	.	TAMPONE AMBIENTA...	27/10/...	CC121	121	ISTITUTO ZOOPROFIL...	Ufficiale	👍 Ok
	Listeria monocytogen...	Swordfish (as animal)	Smoked seafood	07/10/...	CC8	8	ISTITUTO ZOOPROFIL...	Ufficiale	👍 Ok
	Listeria monocytogen...	SALMONE ATLANTIC...	PREPARAZIONI A BAS...	15/05/...	CC9	9	ISTITUTO ZOOPROFIL...	Ufficiale	👍 Ok
	Listeria monocytogen...	.	TAMPONE AMBIENTA...	25/07/...	CC9	9	ISTITUTO ZOOPROFIL...	Ufficiale	👍 Ok
	Listeria monocytogen...	SALMONE ATLANTIC...	TARTARE	11/11/...	CC8	8	ISTITUTO ZOOPROFIL...	Ufficiale	👍 Ok

Figura 6 - Schermata raffigurante una sezione della piattaforma genomica GenPat dedicata ai campioni ed i rispettivi metadati associati.

CC e ST sono ricavati mediante l'approccio MLST (Multi Locus Sequence Type), un metodo di tipizzazione molecolare che analizza le sequenze di frammenti interni di 7 geni housekeeping di *L. monocytogenes*. Sequenze diverse di uno stesso gene corrispondono ad alleli distinti, e per ogni isolato la combinazione degli alleli dei 7 loci in questione ne definisce il profilo allelico, corrispondente numericamente con il Sequence Type. Lo stesso CC identifica un insieme di ST simili.

Ne segue che, per similarità di sequenza, i ceppi con tali parametri di screening uguali presentano la possibilità di essere correlati. Per confermare l'ipotesi si esegue un'analisi cgMLST (core genome Multi Locus Sequence Type), dove il principio del metodo è lo stesso, ma i geni in esame sono 1748. Due o più isolati si definiscono correlati se presentano una distanza allelica inferiore a 7.

Il risultato del lancio della pipeline "ReportTre" su GenPat permette di ottenere una rappresentazione grafica dei dati ottenuti dalla precedente analisi cgMLST. Nello specifico costruisce alberi di distanza tra microrganismi a partire dai loro profili allelici attraverso l'utilizzo dell'algoritmo "Minimum Spanning Tree. Nell'immagine restituisce un albero dove

ogni nodo corrisponde ad un campione selezionato e i rami rappresentano la distanza allelica, per cui la loro lunghezza sarà proporzionale al corrispettivo valore numerico (Figura 7).

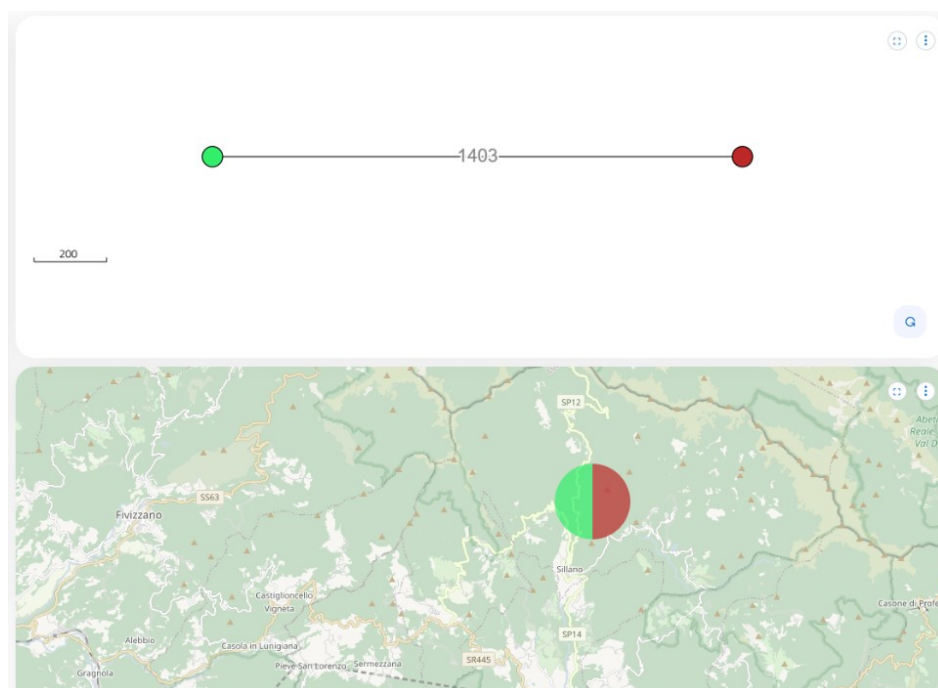


Figura 7 - Albero di distanza allelica di due isolati di *L. monocytogenes* con riferimento geografico dei siti di prelievo [35].

Questo approccio ha molteplici applicazioni, come la valutazione della distribuzione nel territorio di un cluster specifico: dopo aver identificato i ceppi appartenenti si può applicare l'opzione di disporre i singoli campioni sulla mappa geografica in relazione al sito di prelievo [32].

Piattaforma IRIDA-ARIES

La piattaforma IRIDA-ARIES, sviluppata dall'ISS, è un sistema informativo per la raccolta, l'analisi e la condivisione di dati genomici a supporto della sorveglianza delle malattie infettive e delle epidemie di origine alimentare, tra cui la Listeriosi e tossinfezione da STEC. Dopo aver tipizzato e sequenziato i ceppi di *L. monocytogenes* di origine umana, i dati e le sequenze vengono caricati in questa piattaforma dotata di algoritmi automatici per l'identificazione di clusters genomici e di un sistema di allerta automatico.

Il sistema informativo che supporta la sorveglianza genomica nella piattaforma IRIDA-ARIES è composto da due soluzioni software open-source:

- Galaxy-ARIES (Advanced Research Infrastructure for Experimentation in genomics), dove vengono caricati i dati relativi agli isolati e lanciate analisi automatizzate;
- IRIDA (Integrated Rapid Infectious Disease Analysis) per raccogliere le informazioni derivanti dalle analisi in modo che possano essere utilizzate per la sorveglianza e condivise tra utenti sul territorio nazionale.

Col caricamento delle sequenze viene avviato un flusso automatico di lavoro specifico per ogni patogeno, che esegue elaborazioni di assemblaggio, controlli di qualità, tipizzazione (inclusa l'identificazione dei determinanti di antibiotico-resistenza) e il clustering basato sull'analisi del core-genome MLST (cgMLST). Concluso il flusso di lavoro automatizzato, viene generata automaticamente e inviata agli utenti, che hanno caricato i dati, una e-mail che informa della conclusione dell'analisi e contiene un sommario dei risultati dell'analisi di clustering e della tipizzazione. In caso di identificazione di un cluster che coinvolge più Regioni, la comunicazione viene inviata direttamente dal sistema agli utenti delle altre Regioni coinvolte, al Ministero della Salute e all'ISS per garantire il coordinamento e la gestione di eventuali focolai, rappresentando una risorsa chiave del sistema di allerta rapido (RASFF-Rapid Allert System for Food and Feed), attivo 24 ore su 24, istituito con il Reg.(CE) n. 178/2002 [45].

Il CRRLm, autorizzato all'accesso della piattaforma da ISS, su richiesta dell'Autorità Regionale, inserisce nella parte dedicata al proprio progetto regionale, i metadati e i dati di sequenza relativi ad ogni ceppo di origine umana ricevuto, inoltre può scaricare sequenze inserite da ISS ed elaborare i dati lanciando nuove analisi bioinformatiche, infine può tenere sotto controllo la situazione nazionale sulla circolazione dei vari cluster e fare correlazioni anche retrospettive.

1.2.6 Gestione dei ceppi di *Salmonella* al CRRLm

Il CRRLm oltre a *L. monocytogenes*, tra gli altri patogeni causa di MTA, si occupa della tipizzazione e gestione dei ceppi di *Salmonella* veterinari e umani isolati nella Regione Toscana.

Quelli provenienti da matrici veterinarie sono sottoposti a sieroagglutinazione con antisieri per antigeni somatici O per la definizione del sierogruppo, successivamente vengono inviati al C.R.E.P. (Centro di Riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni) dove saranno effettuate ulteriori prove sierologiche per la completa definizione del serovar.

I ceppi di *Salmonella* umani vengono tipizzati al CRRLm attraverso l'esecuzione di una multiplex PCR Real Time che restituisce come risultato un serovar o, se non fosse disponibile, un genovar. In quest'ultimo caso vengono inviati al C.R.E.P. dove sono sottoposti a test di sieroaagglutinazione.

Le informazioni associate all'isolato, compreso il serovar ottenuto dalle prove analitiche, vengono caricati su reti apposite per la raccolta e conservazione dei dati:

- Rete Enter-Net, coordinata dal Dipartimento di Malattie Infettive dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), che raccoglie le informazioni epidemiologiche e microbiologiche relative a *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio* e altri patogeni enterici di origine umana [44];
- Rete Enter-Vet, coordinata dal Centro di Referenza Nazionale per le salmonellosi dell'IZS delle Venezie, che ha la finalità di raccogliere i dati a livello nazionale relativi agli isolamenti di *Salmonella* spp, da campioni di origine veterinaria [44].

In conformità al Regolamento di esecuzione Europeo 2025/179, i ceppi di *Salmonella* spp. veterinari isolati nel contesto dei controlli ufficiali o altre attività ufficiali, di cui si sospetta che siano coinvolti in focolai di MTA, sono sottoposti a sequenziamento dai laboratori ufficiali. Se questi non sono accreditati per l'esecuzione di tale prova, vengono inviati al Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR). I dati di sequenza ottenuti vengono caricati sulla piattaforma genomica GenPat.

La nota ministeriale 0034300 del 26 novembre 2025 (oggetto: "Gestione delle sequenze genomiche di microrganismi patogeni isolati in corso di focolai di malattia a trasmissione alimentare (MTA) - EFSA") riconosce ai LNR dei patogeni in questione la definizione dei criteri per la selezione degli isolati da sottoporre a sequenziamento.

Ad oggi, gli isolati di *Salmonella* sono considerati "associati o di sospetta associazione a un focolaio di tossinfezione alimentare" se rientrano nei contesti sottoelencati:

- Ceppi di *Salmonella* spp. Isolati nell'ambito del piano controllo microbiologico sugli alimenti relativi ai criteri di sicurezza alimentare;
- Ceppi di *Salmonella* spp. Nell'ambito di controlli all'importazione (UVAC, PCF);
- Ceppi di *Salmonella* spp. Isolati nell'ambito del Piano Nazionale Alimentazione Animale (PNAA);

- Ceppi di *Salmonella* riconducibili ai sierotipi rilevanti nell'ambito del Piano Nazionale di Controllo Salmonellosi negli avicoli (PNCS);
- Ceppi di *Salmonella* appartenenti a sierotipi per cui, in base al quadro epidemiologico si evidenzino situazioni che meritano di essere monitorate indipendentemente dal contesto di campionamento e/o che sono oggetto di specifiche comunicazioni anche nel contesto internazionale.

1.3 *Listeria monocytogenes*

1.3.1 Cenni storici

L. monocytogenes (Figura 8) è una specie batterica di particolare significato, non a caso già a suo tempo oggetto di attenzione da parte della Raccomandazione 11 marzo 1994.



Figura 8 - Cellule di *Listeria monocytogenes* [18].

Venne isolato per la prima volta nel 1926 da E.C.G. Murray in seguito ad un'epidemia sviluppatasi in uno stabulario per animali con cavia e conigli infetti [6]. Dai campioni ematici analizzati venne osservato un aumento considerevole del numero di monociti, per questa ragione venne conferito il nome di *Bacterium monocytogenes* [6]. L'anno seguente lo stesso batterio venne isolato da uno scienziato di nome Harvey Pirie dal fegato di gerbilli selvatici conferendogli il nome di *Listerella hepatolytica* in onore di Sir Joseph Lister, un pioniere nel campo dell'antisepsi [6]. Successivamente Pirie si accorse che il genere *Listerella* era già stato assegnato a dei miceti, ragione per cui nel 1940 il nome venne armonizzato a *Listeria monocytogenes* [6]. Si dovette aspettare, però, il 1949 per comprendere la gravità della patologia di cui è responsabile, in seguito all'avvento di una grave epidemia di listeriosi nei neonati verificatosi in Germania. Analizzando istologicamente i granulomi di 85 neonati e feti nati morti si isolò il batterio, che venne identificato erroneamente appartenente al genere

Corynebacterium, per poi essere riconosciuto nel genere *Listeria* [7]. Nel 1981 fu possibile dimostrare la trasmissione del patogeno attraverso la via alimentare, quando si verificò un ulteriore focolaio di listeriosi in Canada. Dall'indagine effettuata era emerso che ciò che accomunava tutte le persone infette era l'ingestione di un'insalata di cavolo, dimostrazione di ciò è stato l'isolamento del ceppo batterico dalla matrice alimentare [8].

1.3.2 Generalità

La attuale classificazione tassonomica raggruppa *L. monocytogenes* al phylum dei *Firmicutes*, classe Bacilli, ordine *Bacillales* e alla famiglia delle *Listeriaceae*. Al genere *Listeria* appartengono 26 specie, tra queste solo 2 sono patogene e solo una è di particolare interesse per la salute umana: *L. ivanovii*, che colpisce principalmente i ruminanti a cui causa aborti ed encefaliti, e *L. monocytogenes*, agente eziologico della listeriosi nell'uomo [4].

È un batterio intracellulare facoltativo, Gram+ e al microscopio appare con forma bastoncellare o come un coccobacillo; è aerobio-anaerobio facoltativo, catalasi positivo, ma ossidasi negativo. Ha la caratteristica di essere mobile, ma solo in un range di temperatura definito compreso tra i 22 e i 28°C, grazie alla presenza di flagelli peritrichi che ne ricoprono la superficie cellulare. Nonostante sia asporigeno e acapsulato, nell'ambiente e nelle attrezzature delle industrie alimentari è molto persistente per la sua capacità di generare biofilm sulle superfici e ciò lo rende particolarmente resistente all'azione dei disinfettanti rendendone difficile la sua eliminazione. Inoltre, riesce a sopravvivere e adattarsi in condizioni di stress: riesce a proliferare in presenza di condizioni usate dalle industrie alimentari per ridurre lo sviluppo microbico come la salagione, la refrigerazione e il sottovuoto [3]. È classificato come psicrofilo, ma il suo range di temperatura di crescita va da 0 a 45°C, per questo sono considerati come alimenti ad alto rischio i cibi RTE (*Ready-to-Eat*, o pronti al consumo) refrigerati, proprio perché non necessitano un trattamento termico prima del consumo [3]. È alofilo e cresce in substrati in cui la concentrazione salina può raggiungere il 20% ed è stabile in un ampio range di pH, che è compreso tra 4.3 e 9.6.

1.3.3 Epidemiologia

Ad oggi si conoscono 13 sierotipi. La caratterizzazione sierologica viene eseguita attraverso l'utilizzo di antisieri per testare la immunoreattività all'antigene somatico O, termostabile e costituito da complessi fosfolipidici e polisaccaridici, e all'antigene flagellare H, di natura proteica e termolabile. I sierotipi 1/2a, 1/2b e 4b sembrano essere i responsabili di più del 90%

dei casi clinici registrati negli ultimi anni, sebbene altri siano stati spesso isolati dagli alimenti, tra cui 1/2c [10]. I ceppi più frequentemente coinvolti in corso di episodi conclamati appartengono al sierotipo 4b (oltre il 50%), mentre i ceppi del gruppo antigenico 1/2 predominano negli isolati dagli alimenti [27].

1.3.4 Incidenza

L. monocytogenes è responsabile di una grave patologia, seppur rara, nell'uomo, la Listeriosi. È sottoposta ad una sorveglianza nazionale e sovranazionale per l'elevato impatto che ha sulla salute umana e per l'alto tasso di ospedalizzazione e mortalità. In accordo con la direttiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio per garantire una adeguata sorveglianza, ogni stato membro dell'Unione deve comunicare informazioni inerenti gli agenti zoonotici, le relative resistenze antimicrobiche e relativi focolai. Dall'analisi di questa mole di dati proveniente da tutti gli stati viene stilato annualmente dall'EFSA in collaborazione con ECDC il rapporto sulle zoonosi. Tra le zoonosi e gli agenti zoonotici per cui è obbligatoria la sorveglianza è presente la Listeriosi e *L. monocytogenes*. Se si confronta il numero di casi confermati umani di quest'ultimo nei report annuali pubblicati dall'EFSA, seppure non siano elevati come le salmonellosi, preoccupa la lieve e costante tendenza all'aumento anno dopo anno. Dai dati raccolti ed analizzati dell'anno 2024 è stata confermata come la zoonosi con il più alto numero di ricoveri e decessi tra le varie MTA (Tabella 2 e Figura 9).

Tabella 2 - Nella colonna a destra è riportato il numero di casi confermati di Listeriosi invasiva registrati nei paesi dell'UE e a sinistra l'anno corrispondente.

Anno	Casi
2011	1516
2012	1720
2013	1883
2014	2217
2015	2183
2016	2500
2017	2475
2018	2544
2019	2621
2020	1887
2021	2363
2022	2780
2023	2952
2024	3041

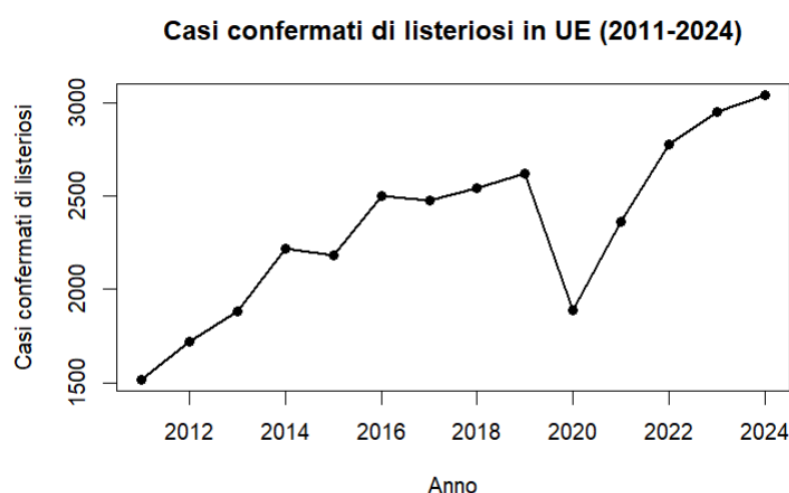


Figura 9 - Grafico a linee con in ascissa i dati della colonna a sinistra Tabella 2 e in ordinata i dati della colonna a destra.

Da questi report si possono visualizzare anche i dati relativi ai singoli Stati, come l'Italia dove si assiste al medesimo aumento della pendenza della curva, con un picco nel 2022 in coerenza al focolaio associato al cluster *L. monocytogenes* ST155 (Tabella 3 e Figura 10).

Anno	casi
2011	129
2012	112
2013	143
2014	132
2015	153
2016	179
2017	164
2018	178
2019	202
2020	155
2021	230
2022	385
2023	231
2024	238

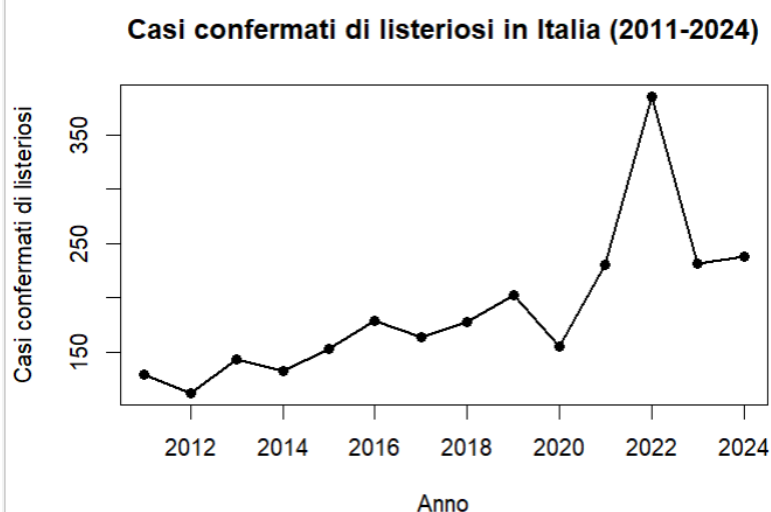


Tabella 3- Nella colonna a destra è riportato il numero di casi confermati di listeriosi invasiva registrati in Italia e a sinistra l'anno corrispondente [12].

Figura 10 - Grafico a linee con in ascissa i dati della colonna a sinistra della Tabella 3 e in ordinata i dati della colonna a destra.

Entrambi i grafici mostrano una diminuzione del numero di casi confermati di listeriosi nel 2020, anche se tale riduzione non risulta statisticamente significativa. Questa riduzione può essere in parte attribuibile alla Brexit; infatti, a partire dal 2020 il Regno Unito non è più incluso nei dati epidemiologici dell'Unione Europea, determinando una riduzione di circa il 14% del numero complessivo di casi confermati di listeriosi invasiva. Escludendo l'effetto dovuto all'uscita del Regno Unito, la diminuzione osservata si riduce a circa il 7%.

Altro fattore da tenere in considerazione per una corretta interpretazione del fenomeno è l'effetto che ha avuto la pandemia di COVID-19 sui dati di sorveglianza. Nello specifico, la Spagna non ha ricevuto dati da tutte le regioni e in Belgio la sorveglianza non copriva tutta la popolazione, ma circa l'80%. Questi fenomeni, a cui si aggiungono le difficoltà organizzative e diagnostiche legate alla pandemia, molto probabilmente hanno determinato una sottostima del numero reale dei casi notificati nel 2020.

Indipendentemente dalle considerazioni fatte, all'apparente riduzione si accosta un reale aumento se si analizzano i dati per singoli casi investigando specifiche fasce d'età della popolazione colpita. La percentuale dei pazienti coinvolti con età superiore a 65 anni ha subito

una variazione da 56,1% a 72,5% e i pazienti con età superiore a 84 anni da 7,3% a 17,2% nel periodo che va rispettivamente dal 2015 al 2020 [15].

1.3.5 Listeriosi negli animali e nell'uomo

L. monocytogenes è un microrganismo ubiquitario, l'ambiente costituisce il suo serbatoio. Gli animali possono infettarsi ingerendo mangimi contaminati o direttamente dalla vegetazione e da ciò ne deriva la contaminazione delle materie prime e i prodotti che si ottengono da queste ultime, anche se sono la contaminazione crociata e le scarse pratiche igieniche le principali responsabili della presenza del patogeno nei prodotti alimentari. Negli animali infetti colonizza il tratto intestinale anche per periodi di tempo molto lunghi e viene diffuso nell'ambiente attraverso l'eliminazione delle feci (Figura 11).

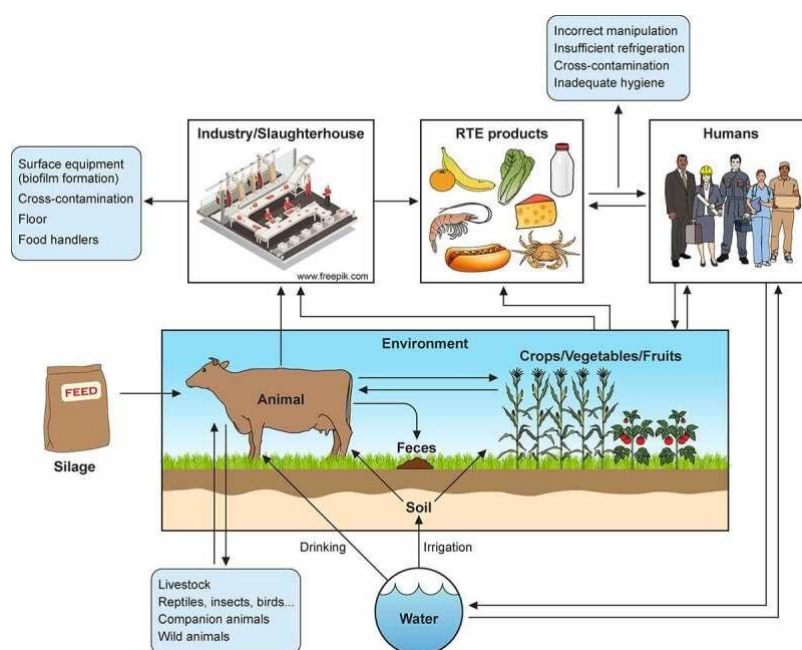


Figura 11 - Schema illustrativo sotto l'ottica One Health della trasmissione del patogeno di interesse nei tre sistemi [16].

La principale forma di infezione per l'uomo è rappresentata dalla via alimentare attraverso l'ingestione di prodotti contaminati [4]. L'infezione, più raramente, può essere dovuta a contaminazione di ferite della pelle o della congiuntiva, dove il patogeno accede direttamente al flusso sanguigno [4]. La gravità della sintomatologia di cui è responsabile nell'uomo dipende dalle condizioni cliniche della persona stessa:

- la forma non invasiva, asintomatica o paucisintomatica, ha un periodo di incubazione breve, mediamente di 24 ore [46], e si manifesta nei soggetti sani ed

adulti [47]. I sintomi sono riconducibili ad una forma simil-influenzale e includono febbre, diarrea, dolori addominali, mialgia e mal di testa [47];

- la forma invasiva presenta un quadro clinico ben più grave con la diffusione del patogeno nei diversi distretti corporei con tempi di incubazione che variano da 1 a 70 giorni [46]. I soggetti immunocompromessi e gli anziani manifestano meningite, meningoencefalite, romboencefalite o ascessi cerebrali [47]. Le donne in gravidanza spesso sviluppano febbre, tremori, emicrania e leucocitosi; si stima che su un terzo dei casi confermati provochi aborto o parti prematuri [47]. I neonati infetti possono presentare polmonite, batteriemie e meningite nei giorni successivi al parto o sviluppare forme neurologiche anche tardivamente [4].

1.3.6 Invasività e fattori di virulenza

L. monocytogenes sfrutta molte strategie per resistere all'acidità dello stomaco e raggiungere l'intestino, che rappresenta il suo sito principale di ingresso [4]. La resistenza all'acidità è determinata da un ottimo sistema tampone intracellulare ottenuto dal sistema GAD (decarbossilasi dell'acido glutammico) e dal sistema ADI (Arginine Deiminasi). Nel primo caso i protoni in eccesso vengono usati per convertire il glutammato in GABA, ad ausilio è presente un trasportatore antiporto che scambia il glutammato esterno con il GABA interno per evitare che il sistema vada in saturazione. La seconda via sfrutta una serie di reazioni per convertire l'arginina prelevata dall'esterno in ammoniaca, che reagisce con i composti acidi all'interno del batterio, e ornitina che viene scambiata con altra arginina in modo che riparta il ciclo [4].

È dimostrata anche una spiccata resistenza alla bile attraverso l'espressione di due geni di virulenza: *bsh* e *bile* che codificano rispettivamente una idrolasi dei sali biliari (bile salt hydrolase) e un sistema di secrezione per la bile (Bile exclusion System) [4].

In questo modo il patogeno può raggiungere gli enterociti, aderirvi e invaderli. Aderisce alle cellule non fagocitarie grazie alla presenza sulla superficie cellulare di specifiche proteine: le internaline InlA e InlB, che si legano rispettivamente ai recettori di superficie E-caderina e Met [4]. L'E-caderina si trova principalmente nelle cellule epiteliali, funge da molecola di adesione per InlA ed è localizzata sulla superficie basolaterale delle cellule dell'intestino tenue. Una volta legata alla molecola InlA induce una riorganizzazione dell'actina citoscheletrica culminando con l'endocitosi mediata da clatrina del batterio [4] (Figura 12). È stato dimostrato

che l'invasione di *L. monocytogenes*, sfruttando il meccanismo associato a InlA, non è limitato solo nella regione del tenue ma si verifica anche nel cieco e nel colon [4].

Il recettore Met è espresso su una maggiore varietà di tipi cellulari, a differenza dell'E-caderina che è principalmente associata alle cellule epiteliali, ed è il recettore del fattore di crescita degli epatociti (c-Met o Hepatocyte Growth Factor). I ceppi di *L. monocytogenes* possono sfruttare il legame tra quest'ultimo e l'internalina InlB per invadere le cellule M nelle placche di Peyer [4].

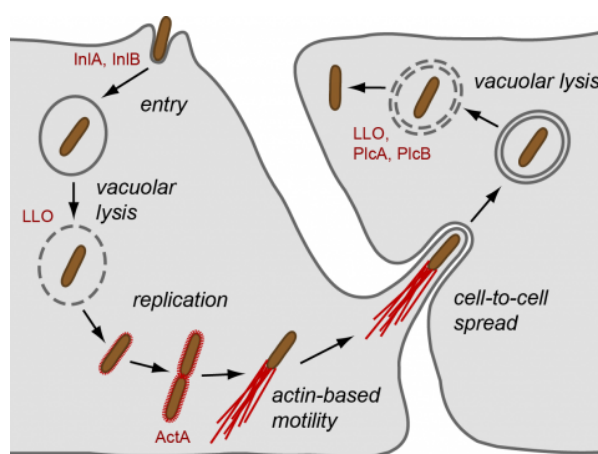


Figura 12 - Rappresentazione schematica del meccanismo di infezione cellulare di *L. monocytogenes* e della successiva diffusione nelle cellule adiacenti [14].

Il legame delle internaline con i corrispondenti recettori cellulari inducono una riorganizzazione del citoscheletro della cellula ospite che termina con la formazione di un vacuolo che ingloba il microrganismo all'interno della cellula. Il patogeno riesce ad eludere la fagocitosi grazie all'espressione di un'emolisina, la listeriolisina O (LLO), inizialmente prodotta in forma inattiva (Figura 12). *L. monocytogenes* sfrutta l'interazione con un enzima, una tiolo-reduttasi detta GILT, normalmente presente nei fagosomi, che riduce la Listeriolisina (LLO) comportandone la sua attivazione [5]. I monomeri di LLO attivati, oligomerizzano a livello della membrana del vacuolo, successivamente cambiano conformazione e portano alla formazione di pori bloccando la fusione con i lisosomi [4]. Il batterio viene liberato nel citoplasma, ambiente ricco di nutrienti, dove si replica a spese della cellula ospite. LLO è responsabile anche della formazione di pori nella membrana citoplasmatica, avendo come effetto uno squilibrio della concentrazione ionica intracellulare: si verifica un ingresso di ioni calcio e un'uscita di ioni potassio verso l'esterno della cellula [4]. E' stato anche dimostrato che LLO è responsabile della frammentazione della rete mitocondriale [17]. Nel citoplasma,

oltre a replicarsi, polimerizza l'actina dell'ospite grazie alla proteina di superficie ActA. Si formano così delle code definite “a cometa” che ne consentono la mobilità spingendo il batterio verso le cellule vicine. Questo origina delle estroflessioni che culminano nella formazione di una vescicola ricoperta da una doppia membrana nella cellula adiacente. In associazione con due fosfolipasi (PlcA e PlcB), LLO favorisce la liberazione nel citoplasma del batterio.

La diffusione da cellula a cellula viene sfruttata soprattutto a livello epatico e attraverso questo meccanismo il patogeno riesce a moltiplicarsi e diffondersi tra le cellule sfuggendo al sistema immunitario dell'ospite [4].

L. monocytogenes è in grado di superare la barriera intestinale e di diffondersi in altri organi attraverso il circolo sanguigno, causando infezioni sistemiche (Figura 13). I primi organi colpiti sono il fegato e la milza, dove si assiste alla formazione di microascessi. Il sistema immunitario ha un ruolo cruciale in questa fase dell'infezione: nei soggetti non immunocompetenti, a partire dalla condizione di batteriemia, *L. monocytogenes* può superare la barriera ematoencefalica e quella fetoplacentare raggiungendo i rispettivi siti d'infezione secondari.

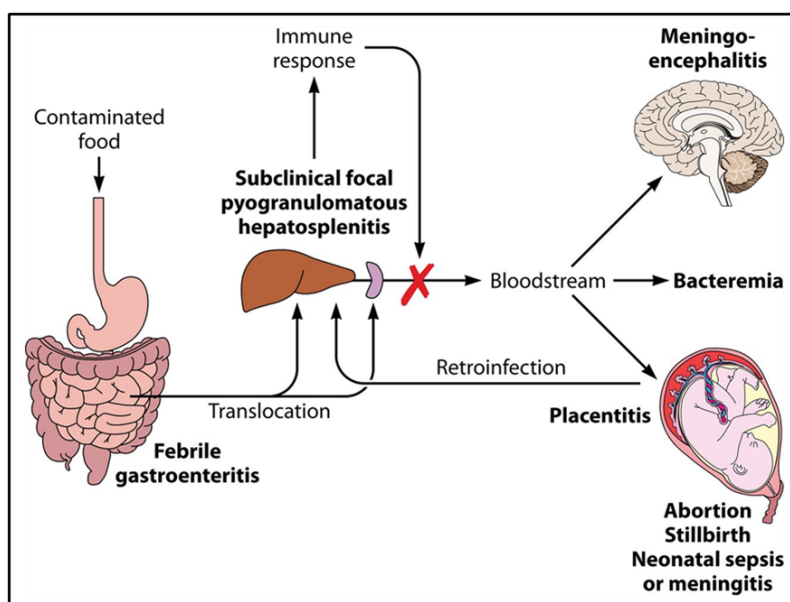


Figura 13 - Diffusione di *L. monocytogenes* dal sito d'ingresso agli organi bersaglio secondari [13].

1.4 *Salmonella*

1.4.1 Generalità microbiologiche

Il genere comprende batteri Gram-negativi, bastoncellari e anaerobi facoltativi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. La maggior parte dei ceppi appartenenti al genere sono mobili grazie alla presenza di flagelli peritrichi. Sono associati principalmente al tratto intestinale dell'uomo e di altri animali, per cui il loro riscontro nelle acque, negli alimenti o nell'ambiente è associato ad una contaminazione fecale [43].



Figura 14 - Cellule di *Salmonella* [9].

Essendo un microrganismo anaerobio-facoltativo *Salmonella* è in grado di produrre ATP sfruttando la respirazione cellulare o attraverso altre vie fermentative, inoltre la maggior parte dei batteri appartenente al genere è in grado di produrre H_2S (acido solfidrico), caratteristica sfruttata in terreni selettivi e differenziali come *Salmonella*-*Shigella* agar (SS) e lo xilosio lisina desossicolato agar (XLD) per l'identificazione. Non è un batterio esigente sotto il profilo dei substrati di crescita ed è in grado di replicarsi in un range di temperatura che va da 5 a 47°C con un picco ottimale di replicazione a circa 34°C. Il pH ideale corrisponde a 6,5-7,5 ma si replica tra 4 e 9. è altamente persistente negli ambienti secchi, infatti sopravvive nei substrati con $a_w < 0,2$ ma per la crescita sono necessari substrati con $a_w > 0,94$ e la crescita è completamente inibita nella condizione: pH < 3,8, attività dell'acqua < 0,94 e temperatura < 7°C [43].

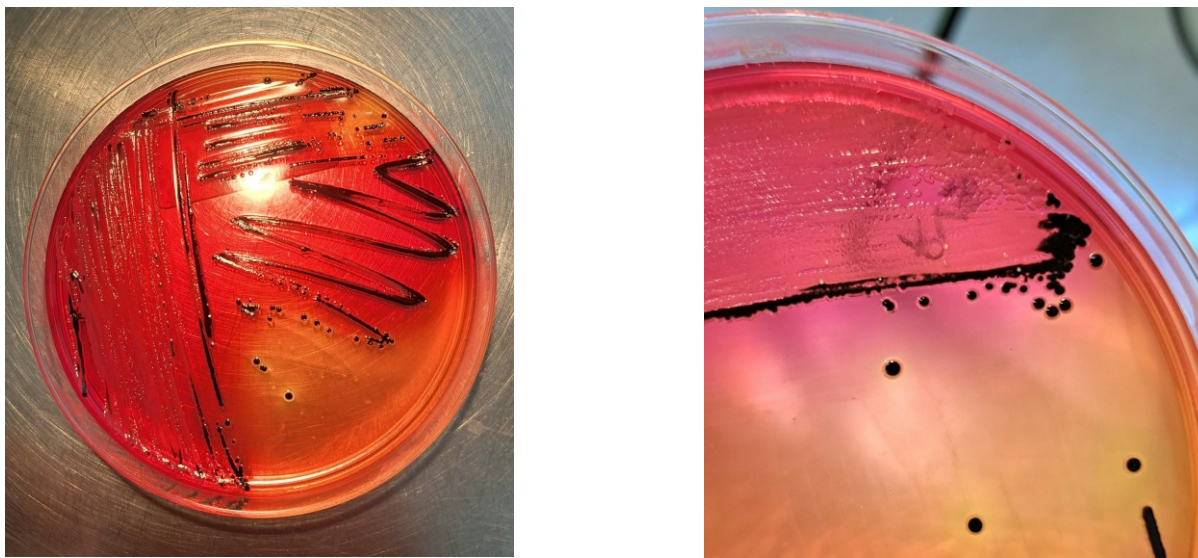


Figura 14 - Colture pure di *Salmonella enteritidis* cresciute in terreno XLD.

1.4.2 Tassonomia

La attuale classificazione tassonomica è piuttosto complessa. Ad oggi sono riconosciute solo due specie: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. La seconda è di minor interesse per la salute umana, in quanto il serbatoio naturale è rappresentato da animali eterotermi e può anche essere isolata dall'ambiente. La specie *S. enterica* è sottoposta a grande attenzione per il grande impatto che ha sulla salute umana visto che è tra le principali cause di MTA nei casi sporadici e nei focolai a livello globale. Viene trasmessa all'uomo attraverso l'ingestione di alimenti di origine alimentare contaminati, soprattutto carne di pollame e ovoprodotti. Ad oggi è suddivisa in sei sottospecie [43]:

- *Salmonella enterica* sottospecie *enterica*. Comprende più di 2500 serovars e rappresentano oltre il 99,5% dei ceppi di *Salmonella* isolati;
- *Salmonella enterica* sottospecie *solamae*;
- *Salmonella enterica* sottospecie *arizonae*;
- *Salmonella enterica* sottospecie *diarizonae*;
- *Salmonella enterica* sottospecie *housteae*;
- *Salmonella enterica* sottospecie *indica*

1.4.3 Formula antigenica

Il genere *Salmonella* è definito dalla presenza di tre antigeni da cui si definisce la formula antigenica, che viene utilizzata per definire i serovar delle sottospecie *enterica* e *bongori*:

- Somatico O, termostabile e rappresentato dalla porzione saccaridica specifica del LPS;
- Flagellare H, termolabile associato al flagello;
- Capsulare Vi, presente solo in alcuni serovar (*Paratyphi C*, *Dublin* e *Typhi*) che hanno dimostrato essere molto più virulenti rispetto a quelli sprovvisti.

La maggior parte delle specie presenta la capacità di variazione antigenica o di fase, ovvero sono in grado di esprimere una per volta due forme diverse di antigene flagellare grazie alla presenza di due geni diversi che codificano per le proteine flagellari; seppur più rare, sono note anche varianti monofasiche e trifasiche. La prima fase è chiamata “fase specifica” e sono responsabili dell’identità immunologica del serovar, mentre la seconda fase è definita “fase non specifica” dove gli antigeni flagellari possono essere espressi anche in altri serovars [33].

1.4.4 Salmonellosi nell’uomo

La patogenicità è determinata dalla presenza di diverse isole di Patogenicità di *Salmonella* (SPI) nel genoma che codificano fattori di patogenicità, tra cui flagelli, capsula, plasmidi, sistemi di adesione e sistemi di secrezione di tipo 3 [43]. Tra questi:

- SPI-1 è necessaria per l’invasione da parte del patogeno nelle cellule ospiti e induzione dell’apoptosi dei macrofagi [43];
- SPI-2 è responsabile della diffusione sistemica e per la replicazione dei macrofagi [43];
- SPI-3 permette la sopravvivenza nei macrofagi [43];
- SPI-4 contiene geni per la secrezione di tossine e la sopravvivenza e l’apoptosi dei macrofagi [43].

Il genere *Salmonella* è responsabile nell’uomo di due tipi di forme:

- La gastroenterica che è autolimitante ed è la più diffusa a livello globale, associata a ceppi di *Salmonella* Non Tifoidee (NTS). I ceppi invadono l’epitelio intestinale senza oltrepassare la mucosa;
- Febbre enterica causata da *Salmonella Typhi* e *Paratyphi* che oltrepassano l’epitelio intestinale, vengono fagocitate dai macrofagi dove sopravvivono e successivamente invadono fegato, milza, linfonodi e midollo osseo [43].

1.5 Risvolti legislativi

1.5.1 Prevenzione per la Listeriosi

La attività di prevenzione della Listeriosi comprende il monitoraggio microbiologico sui prodotti alimentari. Nel settore della sicurezza alimentare viene applicato in due momenti:

- nell'autocontrollo, attraverso l'adozione del sistema HACCP di cui sono responsabili i titolari dell'industria alimentare;
- nel controllo ufficiale, la cui competenza è affidata ad enti, quali le aziende sanitarie e gli istituti zooprofilattici sperimentali.

Nello specifico l'Istituto Zooprofilattico, quale laboratorio ufficiale, fornisce attività di supporto alla Autorità competente attraverso l'esecuzione di analisi microbiologiche, sorveglianza e monitoraggio di *L. monocytogenes* e di altri patogeni alimentari negli alimenti di origine animale e vegetale. Si fa riferimento al regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, che impone agli Stati Membri di effettuare dei controlli ufficiali periodici, dove la periodicità di questi ultimi è stabilita in relazione al rischio per ciascun parametro microbiologico. Diversa è la situazione per gli Operatori del Settore Alimentare (OSA) che possono decidere autonomamente con che frequenze effettuare le analisi secondo il piano HACCP e il rispetto delle norme igieniche, anche se in alcuni casi può essere richiesto di unificare la periodicità per garantire lo stesso livello di controllo e quindi di sicurezza. Questi controlli costituiscono l'attività di prevenzione per tutte le MTA e possono essere effettuati su qualsiasi fase della vita del prodotto alimentare, dalla produzione alla distribuzione, coerentemente con la possibilità di dimostrare il corretto rispetto delle normative da parte degli operatori del settore alimentare [19].

Regolamento 2073 e successive modifiche

Il regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione Europea e successive modifiche tratta diverse tematiche, ma soprattutto definisce i criteri microbiologici negli alimenti di alcuni microrganismi patogeni per poter essere considerati accettabili dal punto di vista della sicurezza per il consumatore, oltre che per verificare il rispetto dei criteri di igiene del processo di manipolazione, lavorazione e distribuzione (definiti nel regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio). L'obiettivo del regolamento europeo è ottenere un “*elevato livello di protezione della salute pubblica*” in quanto “*I rischi microbiologici dei*

prodotti alimentari costituiscono una delle principali fonti di malattie umane causate dagli alimenti”.

Nel regolamento sono riportate diverse definizioni, tra cui quelle di microrganismo e di criteri microbiologici. Questi ultimi sono caratterizzati da elementi come:

- categoria di alimento;
- microrganismo/metabolita o tossina;
- piano di campionamento e limiti di riferimento;
- metodi di analisi (qualitativa o quantitativa, ad esempio conta in piastra o MPN);
- fase alla quale si applica il criterio.

Sono differenziati in:

- criteri di sicurezza alimentare, che devono essere applicati ai prodotti alimentari immessi sul mercato per definirne l'accettabilità o meno dell'alimento;
- criteri di igiene di processo. Si riferiscono alla fase di produzione e se non vengono rispettati ne segue l'adozione di misure correttive. L'EFSA, infatti, sottolinea come la contaminazione sia un evento accidentale, ma sia sempre dovuto al mancato rispetto delle condizioni igieniche sulle diverse fasi di produzione e preparazione.

Il primo criterio di sicurezza alimentare che viene trattato nel regolamento è dedicato al patogeno *L. monocytogenes*. Oltre a definirne i limiti nelle matrici alimentari stabilisce attraverso quali criteri i prodotti vengono considerati non favorevoli alla crescita del microrganismo. I parametri chimico-fisici in questione sono:

- Alimenti con $pH \leq 4,4$ o con $a_w \leq 0,92$;
- Alimenti con $pH \leq 5$ e con $a_w \leq 0,94$;
- Prodotti con conservabilità inferiore a 5 giorni, se i valori di pH e a_w sono superiori a quelli indicati precedentemente.

Di recente è stato emanato un regolamento che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 per quanto riguarda *L. monocytogenes*, il regolamento (UE) 2024/2895 della commissione del 20 novembre 2024.

La legislazione antecedente alla modifica sopracitata prevedeva la distinzione in tre categorie di alimenti:

- *Alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti ai fini medici speciali:* dove si richiedeva l'assenza del patogeno in 25 grammi in 10 unità campionarie;
- *Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di Listeria monocytogenes diversi da quelli destinati a lattanti e a fini medicali speciali.* Si impone:
 - 100 ufc/g in 5 unità campionarie come limite di accettabilità, se i prodotti sono immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità.
 - assenza in 25 g sempre in 5 unità campionarie prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'OSA.
- *Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di Listeria monocytogenes diversi da quelli destinati a lattanti e a fini medicali speciali:* il limite è stabilito a 100 ufc/g su 5 unità campionarie per i prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità [19].

Regolamento 2895/2024

Con l'applicazione a decorrere dal primo luglio 2026, del regolamento 2895 del 2024, viene modificata la voce degli “*alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di Listeria monocytogenes diversi da quelli destinati a lattanti e a fini medicali speciali*” con una ulteriore specifica. L'OSA deve dimostrare che il prodotto non superi il valore limite per *L. monocytogenes* di 100 ufc/g per tutta la durata della *shelf-life* dell'alimento per poter godere di tale tolleranza, altrimenti viene imposto come criterio microbiologico per la conformità la “non rilevazione” del patogeno in 25 g o ml di prodotto in tutte e 5 le unità campionarie anche dopo l'immissione in mercato.

ALLEGATO

L'allegato I, capitolo 1 (Criteri di sicurezza alimentare), del regolamento (CE) n. 2073/2005 è così modificato:

1) la voce 1.2 è sostituita dalla seguente:

Categoria alimentare	Microrganismi/ loro tossine, metaboliti	Piano di campiona- mento		Limiti		Metodo d'analisi di riferimento	Fase a cui si applica il criterio
		n	c	m	M		
«1.2 Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100ufc/g (*)		EN/ISO 11290-2 (**)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
		5	0	Non rilevabile in 25 g (***)		EN/ISO 11290-1	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

(*) Questo criterio si applica se l'operatore del settore alimentare che produce gli alimenti è stato in grado di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che il livello di *L. monocytogenes* non supererà il limite di 100 ufc/g durante il periodo di conservabilità degli alimenti. L'operatore può fissare durante il processo limiti intermedi sufficientemente bassi da garantire che il limite di 100 ufc/g non sia superato al termine del periodo di conservabilità degli alimenti.

(**) 1 ml di inoculo viene posto su una piastra di Petri di 140 mm di diametro o su tre piastre di Petri di 90 mm di diametro.

(***) Questo criterio si applica quando l'operatore del settore alimentare che produce gli alimenti non è stato in grado di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che il livello di *L. monocytogenes* non supererà il limite di 100 ufc/g durante il periodo di conservabilità degli alimenti.»

Figura 16 - Estratto del regolamento (UE) n. 2895/2024.

Da notare la diversa dicitura: non viene più definito “assente in 25 g”, ma “non rilevato in 25 g” (Figura 16). Infatti, l'alimento potrebbe essere contaminato dal patogeno ma quest'ultimo potrebbe avere una concentrazione che è inferiore al limite di sensibilità del metodo utilizzato per l'analisi [21].

Regolamento 2463/2024

Il regolamento di esecuzione (UE) 2024/2463 della Commissione del 12 settembre 2024 stabilisce i metodi di analisi applicabili ai controlli ufficiali effettuati per verificare la conformità degli OSA al regolamento (CE) n. 2073/2005. Il suo scopo è quello di migliorare l'attendibilità dei risultati ed eliminare o contenere i limiti ascrivibili ai metodi di concezione colturale, questo per garantire uniformità, attendibilità, affidabilità e coerenza ai controlli ufficiali. Infatti, prima dell'emanazione del regolamento non esistevano norme dell'Unione relative ai metodi specifici da utilizzare per le analisi di laboratorio nel contesto dei controlli ufficiali.

Rimangono invariati i parametri microbiologici a norma del regolamento 2073/2005 che devono essere rispettati dagli OSA in conformità ai requisiti generali e specifici in materia di igiene di cui all'articolo 4 del regolamento (CE) n. 853/2004.

L'articolo 1 punto 1 del regolamento (UE) 2463/2024 definisce le norme specifiche da adottare nell'analisi dei campioni prelevati durante i controlli ufficiali, di cui all'allegato I del regolamento n. 2073.

Il vero punto di svolta è rappresentato dal secondo punto dell'articolo 1, perché concede e standardizza l'utilizzo di metodi alternativi, *compresi quelli proprietari*, ai laboratori ufficiali, a condizione che ne sia assicurata la validità dei risultati. Ragione per cui è necessario che “*tali metodi di analisi alternativi siano validati in base ai metodi di analisi di riferimento di cui all'allegato I del regolamento (CE) n. 2073/2005 e siano validati per la categoria di alimenti specificata nel pertinente criterio microbiologico di cui all'allegato I del regolamento (CE) n. 2073/2005*”. La validazione di un metodo di analisi dimostra l'idoneità di una procedura per l'uso specifico previsto.

Si evidenzia l'affinità di specifici concetti tra il regolamento 2463 e la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, il cui accreditamento è obbligatorio per tutti i laboratori ufficiali che eseguono singole prove su matrici alimentari. In particolare, il regolamento emanato nel 2024, non impone l'utilizzo esclusivo di metodi riportati all'allegato I, ma permette anche l'impiego di metodi alternativi. Analogamente, la ISO 17025 ammette l'uso di metodi sviluppati o modificati dal laboratorio, a condizione che siano adeguatamente validati e idonei allo scopo. Viene riconosciuta la competenza del laboratorio, per cui si dà la possibilità di scegliere il metodo analitico più appropriato per lo svolgimento delle analisi. Il Regolamento (UE) 2024/2463 fa, quindi, proprio uno dei principi di fondo della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, che corrisponde alla sempre maggiore valorizzazione del fattore umano nella pratica analitica. Si rimarca il concetto seguente: l'affidabilità del risultato analitico non dipende solo dall'applicazione della norma tecnica di riferimento, ma soprattutto dalla competenza tecnica del personale del laboratorio.

La concessione all'utilizzo di metodi alternativi permette anche di ovviare ai limiti dei metodi colturali tradizionali, che sono principalmente due:

- in caso di microrganismi stressati potrebbero essere meno sensibili, in particolare nei metodi molecolari, sottostimando la presenza di patogeni che su terreni selettivi hanno più difficoltà a rivitalizzarsi;
- possono avere dei tempi di analisi piuttosto prolungati; questo è un fattore molto importante per il settore alimentare. Ad esempio, alcuni prodotti hanno una *shelf life* molto breve ed è necessaria la tempestività dei risultati per poter ritirare dal commercio i prodotti non conformi.

Con l'adozione di protocolli alternativi, ad esempio metodiche PCR, si riducono i tempi di analisi dei campioni rispetto ai metodi tradizionali colturali. Questi ultimi possono richiedere anche l'impiego di diversi giorni prima di poter dare una risposta, mentre con tecniche di amplificazione di specifiche porzioni del DNA presente nel campione, i tempi di risposta possono ridursi a 24 ore per dare un risultato negativo. Purtroppo, però, ad oggi le tecniche di biologia molecolare presentano un grande limite: nel caso di una positività non riescono a differenziare la presenza di DNA derivante da un microrganismo vitale o no. Per cui i metodi colturali per dimostrare la presenza di un patogeno nell'alimento non possono essere sostituiti completamente e rimangono, per la conferma del positivo, quelli di elezione. Nonostante i limiti, l'adozione di metodiche alternative ha reso la gestione dei controlli più efficiente, senza rinunciare all'affidabilità dei risultati [22].

1.5.2 Sorveglianza della Listeriosi nell'uomo

La Listeriosi invasiva nell'uomo è sottoposta ad un piano di sorveglianza nazionale e sovranazionale (Figura 17).

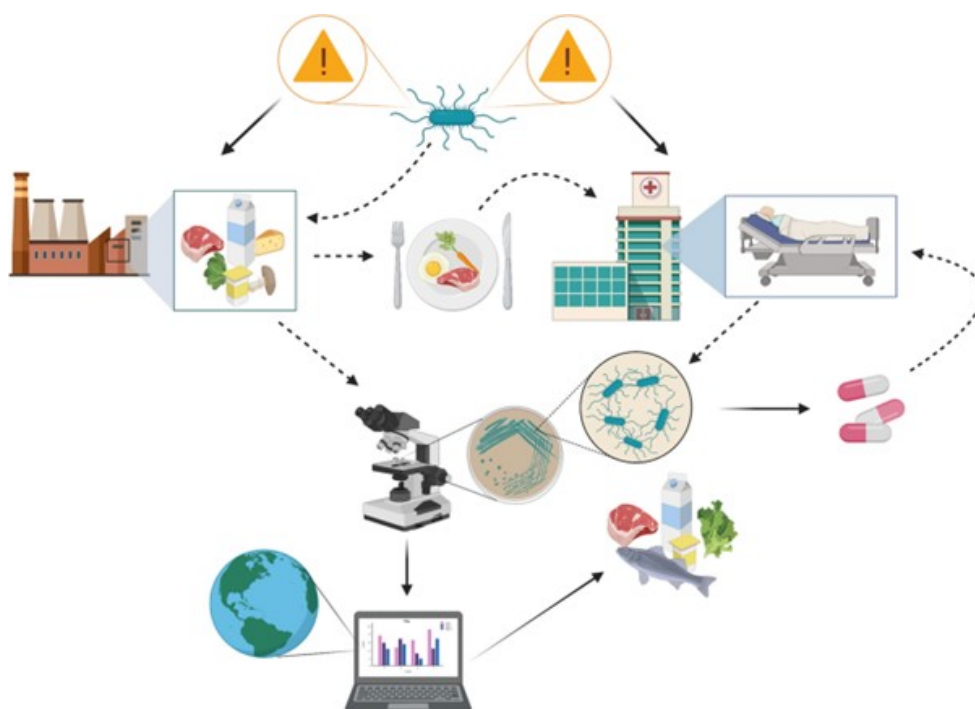


Figura 17 - Diffusione e piano di sorveglianza di *L. monocytogenes* da cui vengono emessi i report epidemiologici [29].

In Italia è esplicitata con l'obbligo di notifica dei casi di listeriosi e con la raccolta e l'analisi dei ceppi clinici di *L. monocytogenes*. I ceppi isolati e tutte le informazioni raccolte dalla caratterizzazione vengono inoltrare all'Istituto Superiore di Sanità che procede col sequenziamento del genoma, nel caso dei laboratori che non effettuano il sequenziamento WGS. Il modello di sorveglianza molecolare sviluppato per *L. monocytogenes* è applicabile anche agli altri patogeni.

Regolamento 179/2025

Il regolamento di esecuzione (UE) 2025/179 della Commissione del 31 gennaio 2025 riconosce il grande contributo dato dalle moderne metodiche di biologia molecolare nel campo del sequenziamento per le indagini epidemiologiche. L'analisi delle sequenze genomiche permette una caratterizzazione rapida dei cluster e restituisce un risultato che può essere considerato l'impronta digitale del microrganismo. Si ottengono, così, risultati chiari e inconfutabili sulla correlazione della patologia clinica umana o veterinaria col patogeno isolato dalla matrice alimentare sospetta, dal mangime o dall'ambiente correlato durante l'indagine di un focolaio.

Tale regolamento definisce l'obbligo per l'Autorità competente di raccogliere ("*senza indebito ritardo*") tutti gli isolati di *S. enterica*, *L. monocytogenes*, *Escherichia coli*, *C. jejuni* e *C. coli*

da campioni di alimenti, animali e di mangimi e da campioni ambientali prelevati presso gli OSA e dei mangimi e durante i controlli ufficiali, nel caso siano correlati, o si sospetti, ad un focolaio di tossinfezione alimentare. Definisce il conferimento dei ceppi presso laboratori ufficiali accreditati secondo la norma ISO EIC 17025 per effettuare le prove di caratterizzazione, e definisce l'esecuzione del WGS su almeno un isolato di ogni sierotipo, biotipo o tipo molecolare degli isolati raccolti. I dati di sequenza ottenuti dal sequenziamento dovranno essere raccolti e trasmessi all'Autorità competente.

Con la seguente gestione degli isolati e dei dati di tipizzazione ottenuti si agevolano le indagini nell'ambito di focolai di tossinfezione alimentare e si individuano tempestivamente le fonti.

Il presente regolamento entra in vigore il ventesimo giorno successivo alla pubblicazione nella Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea e si applica a decorrere dal 23 agosto 2026 [23].

2. SCOPO DEL LAVORO

La sicurezza alimentare costituisce uno degli obiettivi di fondo della legislazione europea, correttamente inserita in un principio 'strategico' più ampio di tutela della salute e salvaguardia delle risorse.

Va considerato come la legislazione abbia progressivamente sviluppato il concetto di sicurezza alimentare in termini di evoluzione dell'originario criterio della igiene degli alimenti, codificato dalle direttive che negli anni Novanta introdussero i due livelli basilari di controllo (controllo ufficiale ed autocontrollo) su cui la igiene degli alimenti doveva trovare, e trova tuttora, fondamento.

Volendo individuare un preciso momento di 'configurazione' del concetto più completo di sicurezza alimentare appare ragionevole individuare la emanazione del Regolamento (UE) n. 1169/2011 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 25 ottobre 2011.

Tale provvedimento, finalizzato ad imporre l'obbligo di fornire informazioni corrette a tutti i consumatori, ha inserito correttamente proprio il consumatore come fattore irrinunciabile in una prospettiva reale di sicurezza alimentare, ritenendo inammissibile perseguire tale obiettivo senza il coinvolgimento diretto dell'"elemento consumatore" quale protagonista attivo della propria sicurezza, e come tale in grado di effettuare in ogni circostanza scelte consapevoli.

La sicurezza alimentare rappresenta tra l'altro una competenza istituzionale della figura professionale del biologo: tra le motivazioni di tale attribuzione, riconducibile all'articolo 3 della Legge 24 maggio 1967, n. 396 (Ordinamento della professione di biologo) va verosimilmente considerata anche la specifica conoscenza della 'macrodisciplina' microbiologia da parte del biologo.

La non casuale correlazione tra sicurezza alimentare e risvolti microbiologici trova del resto conferma in quei provvedimenti europei definiti 'raccomandazioni' che da oltre trent'anni costituiscono importanti linee di indirizzo per il coordinamento del controllo ufficiale nei diversi Paesi Europei.

Già la prima di tali raccomandazioni, emanata nell'anno 1994, indicava non secondari parametri microbiologici (la aflatossina B1 e la specie batterica *L. monocytogenes*) sui quali incentrare l'attenzione.

Il presente lavoro di tesi si inserisce in tale contesto sviluppandosi dalla Sicurezza Alimentare secondo un approccio One Health. Il lavoro di tesi si articola attraverso l'attività di sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare (MTA) condotta a livello regionale dal Centro di Riferimento Regionale per *Listeria monocytogenes*.

Nel periodo che va dal 16 marzo 2026 al 21 settembre 2026 presso il Centro *Listeria* sono stati identificati e caratterizzati diversi isolati di microrganismi patogeni coinvolti in casi di malattie a trasmissione alimentare con interesse Europeo. Questo lavoro ha lo scopo di illustrare come il CRRLm, con l'ausilio anche di altre strutture, contribuisca alla rete di sorveglianza a livello nazionale per i patogeni alimentari e alla gestione dei casi di MTA nella Regione Toscana.

Per ottenere alti livelli di sicurezza nei prodotti alimentari sono adottate misure di prevenzione e sorveglianza su diversi livelli di organizzazione: si parte a livello regionale, con la raccolta e la caratterizzazione degli isolati, per poi effettuare delle comparazioni dei dati di sequenza con gli isolati a livello nazionale (ISS) e successivamente Europeo (EFSA-ECDC). Con questo schema si ottengono dati di diffusione che permettono di approfondire e seguire l'epidemiologia. Il flusso per la elaborazione e gestione di dati e metadati è ancora in fase di ottimizzazione ed è stato sviluppato inizialmente solo per *L. monocytogenes* per poi essere esteso anche ad altri patogeni.

È stata data una maggiore attenzione alla Listeriosi che, nonostante sia molto meno frequente rispetto agli altri agenti zoonotici con 1715 casi nel 2024, preoccupa maggiormente per i tassi di ospedalizzazione (97,3%) e mortalità (15,6%). Vengono trattati anche altri patogeni alimentari tra cui la *Salmonella*, molto diffusa in tutti gli Stati membri e con tre serovars responsabili di forme patologiche invasive, e *Campylobacter*, che con più del doppio dei casi di salmonellosi nel 2024 si conferma la zoonosi maggiormente riportata tra i Paesi UE (168.396 casi). I dati sono aggiornati all'ultimo report stilato dall'EFSA e l'ECDC inerente all'anno 2024.

3. MATERIALI E METODI

3.1 *Listeria monocytogenes*

La prevenzione si basa sulla ricerca del patogeno non solo negli alimenti durante le diverse fasi della produzione, ma anche nell'ambiente di lavorazione, comprese le attrezzature e le superfici dove può produrre biofilm, al fine di individuare tempestivamente eventuali fonti di contaminazione.

In base al piano di campionamento regionale/ministeriale le matrici alimentari sono prelevate alla distribuzione o in qualsiasi altra fase della produzione, per poi essere inviati alla sede IZS territorialmente competente per procedere all'analisi.

I campioni vengono accettati e, dopo il caricamento delle prove sul sistema informatico, ha inizio la gestione dei campioni nel laboratorio di Microbiologia degli alimenti - area anonimizzazione dove si effettua l'apertura dei prodotti e il prelievo di *Test portion* (Figura 18), che saranno poi trasferite nel laboratorio che si occuperà dell'analisi.

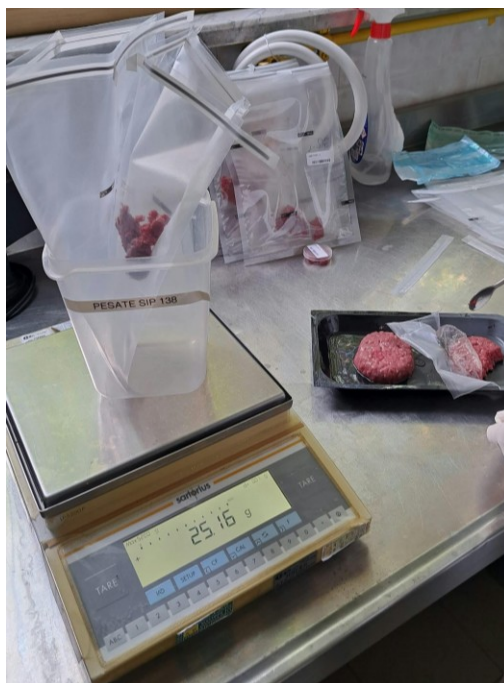


Figura 18 - Apertura del campione durante il prelievo del Test portion, che ne consente l'anonimizzazione per l'esecuzione delle successive prove analitiche.

Il numero di unità campionarie e la quantità in g o ml della matrice da prelevare è definito dal regolamento (CE) 2073/2005.

Capitolo 1. Criteri di sicurezza alimentare

Categoria alimentare	Microrganismi/loro tossine, metaboliti	Piano di campionamento (1)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio
		n	c	m	M		
1.1. Alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali (4)	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	►M9 Non rilevabile ◀ in 25 g		EN/ISO 11290-1	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.2. Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g (5)		EN/ISO 11290-2 (6)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
		5	0	Non rilevabile in 25 g (7)		EN/ISO 11290-1	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.3. Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali (4) (8)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2 (6)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

Figura 19 - L'immagine riporta un estratto dell'allegato I, capitolo 1, del regolamento (CE) n. 2073/2005 [19].

Per la ricerca del genere e per *L. monocytogenes* negli alimenti la procedura di riferimento, come riportato nell'allegato 1 del regolamento di esecuzione (CE) 2073/2005, è la norma tecnica UNI EN ISO 11290-1, per l'analisi quantitativa la norma tecnica UNI EN ISO 11290-2.

3.1.1 Norma tecnica UNI EN ISO 11290-1

È una norma tecnica redatta dall'Organizzazione mondiale di standardizzazione, adottata a livello europeo dal Comitato Europeo di Normazione (CEN) e recepita in Italia dall'ente Nazionale Italiano di Unificazione (UNI). È applicabile sui prodotti destinati al consumo umano o animale e su campioni ambientali prelevati nelle fasi di produzione e manipolazione degli alimenti.

Nella procedura viene indicato, nella prima fase dell'analisi, l'utilizzo di un arricchimento selettivo, perché spesso i prodotti contaminati da *L. monocytogenes* presentano una carica di quest'ultimo molto bassa e una flora batterica in quantità nettamente superiore rispetto al patogeno ricercato. L'obiettivo è quello di far crescere tutti i ceppi, anche quelli più stressati, di *L. monocytogenes*. Per questo si effettuano due arricchimenti successivi con il primo contenente la metà della concentrazione degli agenti selettivi; il secondo serve ad inibire ulteriormente la flora batterica competitiva favorendo la crescita selettiva di *Listeria* spp.

Il primo step per la ricerca è l'esecuzione dell'arricchimento primario dopo il prelievo del Test portion, eseguito in conformità delle ISO 6887 e 18593, a cui si aggiungono 225 ml di Half Fraser Broth ai 25 g/ml dell'aliquota. Le buste vanno incubate ad una temperatura di 30 °C per

25±1 ora, trascorse le quali si preleva 0,1 ml dall'arricchimento primario e lo si inocula in una provetta contenente 10 ml di Fraser Broth. Così ottenuto l'arricchimento secondario, viene incubato a 37°C per 24 ±2 ore.

Sia dal primario che dal secondario arricchimento, trascorso il tempo di incubazione, si prelevano 10 µl e si seminano per spatolamento su due terreni:

- Agar Listeria secondo Ottaviani & Agosti a 37°C per un totale di 48 ±2h: è un terreno selettivo e differenziale per *L. monocytogenes*. Si sfrutta la capacità del genere *Listeria* di metabolizzare il substrato X-glucoside attraverso l'enzima β -glucosidasi e ottenere, così, delle colonie dal colore verde-azzurro (Figura 20). È differenziale per la presenza di un composto lipidico che permette a *L. monocytogenes* di creare un alone opaco attorno alla colonia per azione dell'enzima fosfolipasi C (Figura 20). Per una corretta analisi bisogna tenere presente che in condizioni di stress alcuni ceppi potrebbero avere un alone molto ristretto o anche non averlo.

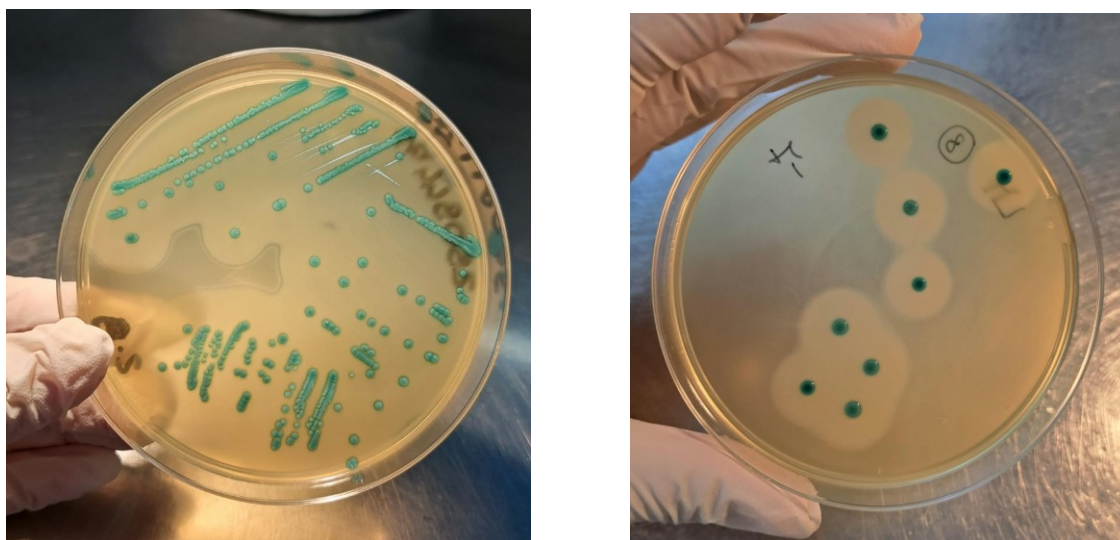


Figure 20 - Crescita di colonie di *L. monocytogenes* su terreno ALOA.

- un secondo terreno selettivo, come LSM Oxford agar a 37°C per 48 ±2h: è un terreno con attività differenziale per il genere *Listeria* per la presenza dell'esculina, che viene idrolizzata ad esculetina. Quest'ultima reagisce con il citrato ferrico causando la formazione di colonie che appaiono nere al centro e circondate da un

alone nero (Figura 21). Essendo una caratteristica condivisa da tutto il genere, non è possibile distinguere *L. monocytogenes* dalle altre specie non patogene.



Figura 21 - Crescita di colonie del genere *Listeria* su OXFORD agar, dove non è possibile stabilire se siano presenti ceppi appartenenti alla specie *monocytogenes*.

Visto e considerato che i ceppi di *L. ivanovii* non possono essere distinti dai ceppi di *L. monocytogenes* attraverso l'isolamento colturale indicato dalla norma tecnica, dopo aver identificato le colonie sospette si prosegue con l'esecuzione dei test di conferma.

Il genere *Listeria* predomina sulla specie *monocytogenes*, ragione per cui in presenza di una co-contaminazione di diverse specie appartenenti allo stesso genere di quella ricercata può essere difficile l'isolamento del patogeno. Condizione visibile in Figura 22, dove l'alone non è circoscrivibile a specifiche colonie.



Figura 22 - Piastra di ALOA su cui si riscontra la presenza di più specie appartenenti al genere *Listeria*.

Per la conferma si preleva almeno una colonia sospetta ben isolata e la si semina per isolamento su un terreno nutritivo non selettivo, come il TSYEA dove il patogeno di interesse dopo 24 ore a 37°C cresce formando colonie dal diametro di 1-2 mm convesse, incolori, opache e con bordo regolare.



Figura 23 - TSYEA su cui sono state seminate 5 colonie diverse di *L. monocytogenes*.

I test di conferma di genere e specie sono i medesimi della parte 2 della norma tecnica e vengono trattati nel paragrafo seguente.

3.1.2 UNI EN ISO 11290-2

Il metodo della conta viene applicato nel caso degli “*alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes* diversi da quelli destinati a lattanti e a fini medicali speciali*” immessi sul mercato. A condizione che il produttore dimostri, con soddisfazione dell’Autorità competente, che il prodotto non supererà il valore limite di 100 ufc/g durante tutto il periodo della sua conservabilità.

Questa norma può essere utilizzata per poter effettuare la conta di *Listeria* spp. o *L. monocytogenes* su prodotti destinati al consumo umano e all'alimentazione animale e campioni ambientali prelevati nelle aree della produzione e manipolazione degli alimenti. Si sfrutta la capacità del patogeno di formare colonie tipiche su terreni solidi selettivi specifici e caratteristiche morfologiche, biochimiche e fisiologiche descritte nei paragrafi successivi.

Questa procedura è simile alla parte 1 della ISO 11290, con la differenza che non viene eseguita la fase dell'arricchimento, in quanto favorirebbe la proliferazione del ceppo presente nel campione causando una sovrastima del risultato. In questo caso si vuole verificare l'effettiva carica batterica di *L. monocytogenes* presente al momento dell'analisi. Per la diluizione iniziale e le successive può essere utilizzato il brodo Half fraser, ma con una composizione diversa rispetto a quello usato nel metodo della ricerca: nel metodo della conta non è necessario aggiungere il supplemento cloruro di litio, che costituisce l'agente selettivo per inibire la proliferazione della flora batterica contaminante nella fase dell'arricchimento primario.

Si inizia sempre preparando i Test portions in conformità con le ISO 6887 e ISO 18593. Le diluizioni del campione 1:10 si possono ottenere attraverso l'utilizzo dell'Half fraser broth, o del Buffered peptone water o altri diluenti indicati nella ISO 6887.

Si semina per spatolamento 0,1 ml della sospensione iniziale (o del campione se è liquido) e 0,1 ml delle ulteriori diluizioni decimali, sulla superficie di piccole piastre (90 mm) ALOA (Agar *Listeria* according to Ottaviani Agosti).

Per stimare concentrazioni più basse (come 100 ufc/g o ml) si possono aumentare i limiti di sensibilità del metodo di un fattore 10 piastrando 1 ml del campione di prova, se è liquido, o 1 ml della sospensione iniziale e distribuirlo uniformemente sulla superficie di una piastra Petri grande (140 mm) o sulla superficie di tre piastre piccole (90 mm). Dopo aver aspettato che si siano asciugate, disporle in incubazione a 37°C per 24 ±2h, trascorsi i quali si può effettuare una prima lettura. Ciò permette di discriminare come singoli i diversi aloni che potrebbero sovrapporsi nel caso di una eccessiva crescita. Segue una seconda incubazione alle medesime condizioni della prima e al suo termine si ricercano le colonie presuntive di *L. monocytogenes*, che si manifestano con una colorazione blu-verde con un alone opaco attorno. Per ottenere il dato quantitativo, si contano queste colonie da ciascuna piastra Petri contenente meno di 150 colonie tipiche, o 360 se si utilizzano le piastre Petri da 140 mm.

Come è stato già sottolineato nella ISO 11290-1 per la ricerca, anche *Listeria ivanovii* cresce con le medesime caratteristiche di *Listeria monocytogenes*, per cui è importante procedere con i test di conferma. Questi sono i medesimi di quelli riportanti nella parte 1 della ISO. Si procede prelevando un massimo di 5 colonie ben isolate per piastrarle su un terreno non selettivo, come TSYEA, e disposte nell'incubatore a 37° per 18-24 ore.

Test di conferma per definire il genere e la specie

Per verificare l'appartenenza al genere vengono eseguiti:

Test dell'ossidasi: serve a verificare che il ceppo possieda l'enzima citocromo c ossidasi. Per la sua esecuzione basta prelevare con un'ansa sterile una colonia batterica e strisciarla su una striscia reattiva. Se il ceppo è ossidasi positivo si svilupperà una colorazione viola nella regione di inoculo entro 5 secondi (Figura 24). Il genere di nostro interesse deve dare un esito negativo.



Figura 24 - Striscia reattiva su cui è stato testato un ceppo di *Vibrio* spp. con esito positivo della reazione.

Test della catalasi: si deve disporre una goccia di perossido di idrogeno (H_2O_2) su un vetrino. Con un'ansa sterile prelevare una colonia isolata della coltura e stemperarla nella goccia; lo sviluppo immediato di bolle dimostra la positività della reazione (Figura 25).

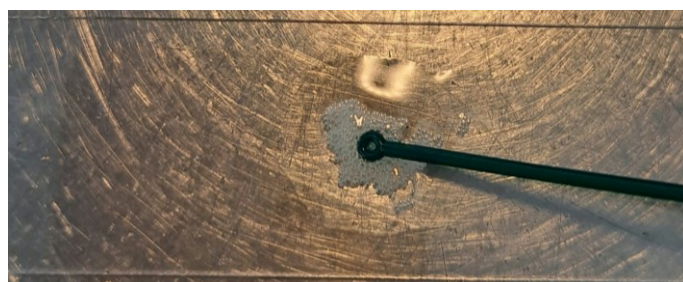


Figura 25 - Esecuzione del test catalasi su un ceppo di *L. monocytogenes* con formazione di gas (O_2).

Osservazione al microscopio di un vetrino dopo colorazione di Gram: si stempera una piccola quantità della coltura batterica in una goccia di acqua o soluzione fisiologica sterile. Si fissa il vetrino alla fiamma e si procede utilizzando il primo colorante, il cristal violetto. Si lascia agire un minuto e si sciacqua con acqua. Si aggiunge un fissativo, lo si lascia agire un minuto per poi sciacquare. Si procede decolorando per 10 secondi ed infine si ricopre il preparato con la

safranina per un minuto. A questo punto si sciacqua con acqua e si lascia asciugare, si aggiunge l'olio sul vetrino e si procede con la visualizzazione dell'immagine al microscopio con l'obiettivo ad immersione (100X), che permette un ingrandimento maggiore. *L. monocytogenes* si presenta come bacilli corti e sottili o coccobacilli Gram positivi.

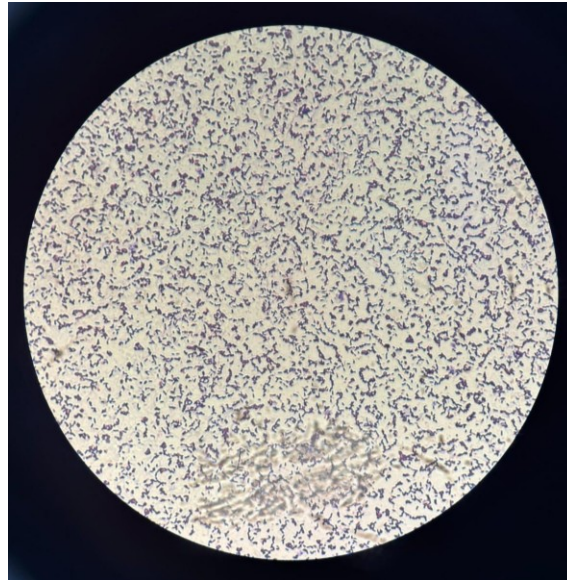


Figura 26 - Fotografia dall'oculare del microscopio ottico di un vetrino di *L. monocytogenes* precedentemente colorato con la colorazione di Gram.

Per verificare l'appartenenza alla specie *monocytogenes* vengono eseguiti:

- Test di fermentazione degli zuccheri: Si mette in incubazione a 37°C per 24 ore e si procede con la lettura dei risultati ogni giorno fino a 5 giorni per verificare l'esito della reazione; infatti, alcuni ceppi di *Listeria* presentano una ridotta capacità di fermentazione degli zuccheri e, di conseguenza, la positività può non essere visibile dopo la prima incubazione. L'esito positivo della reazione si osserva con l'acidificazione del terreno osservabile grazie alla presenza di un indicatore di pH con viraggio di colore da viola a giallo (Figura 27). La specie *monocytogenes* presenta la capacità di fermentare solo il ramnosio, la specie *innocua* è negativa per lo xilosio e variabile per il ramnosio, mentre la specie *ivanovii* fermenta solo lo xilosio.

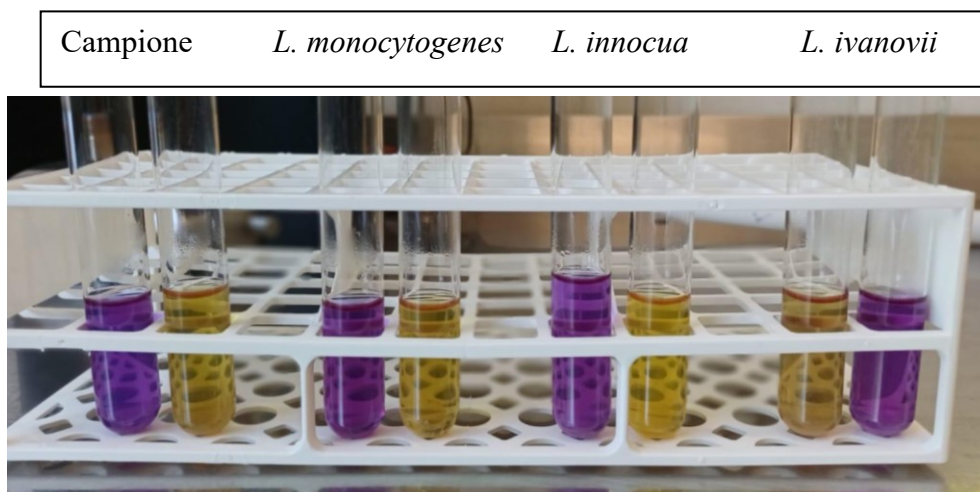


Figura 27 - Lettura del risultato del test di fermentazione degli zuccheri eseguito sul campione sospetto da confermare e su ceppi ATCC di riferimento.

- Test dell'emolisi: viene eseguito strisciando la colonia sospetta e i controlli su un terreno agar sangue non selettivo con un'ansa e incubazione a 37°C per 24 h $\pm$ 2h. Per visualizzare meglio la reazione è consigliato rompere il terreno con l'ansa dopo aver prelevato il ceppo. Per eseguire una lettura ottimale si può rimuovere la crescita della coltura batterica dalla superficie della piastra e attorno al sito di inoculo. Generalmente si ha una β -emolisi marcata per la specie *ivanovii*, *monocytogenes* ha un'emolisi totale, ma meno evidenziata rispetto alla prima, mentre la *innocua* è negativa (Figura 28).
- CAMP Test (facoltativo): è consigliato se la lettura dei risultati del Test dell'emolisi è di difficile interpretazione. Per la sua esecuzione si procede strisciando un ceppo β -emolitico di *S. aureus* e un ceppo di *Rhodococcus equi* verticalmente in una piastra ASC, in modo tale che le due colture siano parallele e diametralmente opposte. Successivamente si semina una colonia ben isolata del ceppo in esame in modo tale che sia ad angolo retto rispetto alle prime due colture, ma senza mai toccarle. Nel punto più vicino il ceppo in esame deve distare circa 1-2mm dalle altre. Si considera positiva la reazione con *R. equi* se la zona di emolisi è visualizzabile come un'ampia "punta di freccia" (da 5 a 10 mm). Si considera positiva la reazione con *S. aureus* se la zona di emolisi si estende solo per circa 2 mm. *L. monocytogenes* è positivo solo per la reazione con *S. aureus*, *L. ivanovii* è positivo solo per la reazione con *R. equi* e *L. innocua* è negativa per entrambe le reazioni (Figura 29).

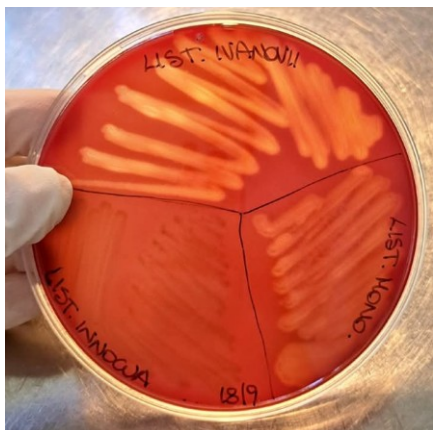


Figura 28 - ASLBC agar su cui è stato effettuato il test di emolisi seminando ceppi di *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovii*.



Figura 29 - ASC agar su cui sono stati strisciati verticalmente i ceppi di *Rhodococcus equi* e *Staphylococcus aureus*, mentre orizzontalmente i tre ceppi di *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. innocua*.

3.1.3 Sierotipizzazione sierologica

Tutti i ceppi di *L. monocytogenes* veterinari dopo essere stati isolati e confermati vengono trasferiti dal laboratorio alimenti al CRRLm, dove saranno sottoposti a sierotipizzazione sierologica e molecolare. Queste ultime saranno eseguite anche su ceppi umani isolati da presidi ospedalieri, policlinici universitari della regione Toscana e laboratori privati nell'ambito regionale di competenza.

La attuale classificazione di *L. monocytogenes* prevede la discriminazione dei ceppi in 13 sierotipi in base all'espressione sulla superficie cellulare di specifici antigeni somatici O (attraverso la tecnica di agglutinazione su vetrino) e antigeni flagellari (attraverso analisi di sieroagglutinazione ma su piastre con fondo a U).

Per la ricerca degli antigeni somatici si stempera una piccola quantità della colonia in una goccia di antisiero seguendo lo schema riportato in Figura 30.

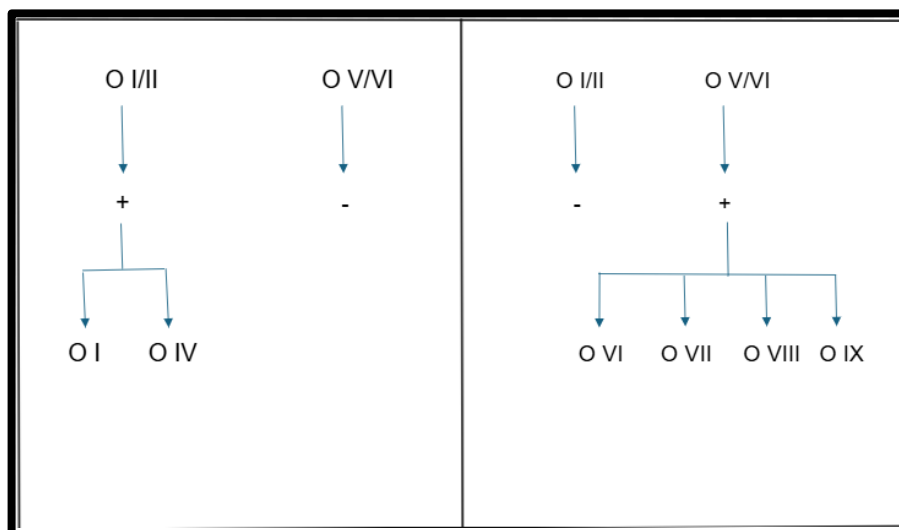


Figura 30 - Schema di utilizzo degli antisieri in relazione all'esito della reazione di agglutinazione ai reagenti di screening (O I/II e O V/VI).

Vengono utilizzati prima antisieri polivalenti: O I/II e O V/VI. Nel caso di positività (evidenziabile con la formazione di agglomerati, Figura 31) al primo, segue l'utilizzo di antisieri monovalenti O I e O IV. Nel caso di positività al secondo polivalente, si testano i monovalenti O VI, O VII, O VIII e O IX.

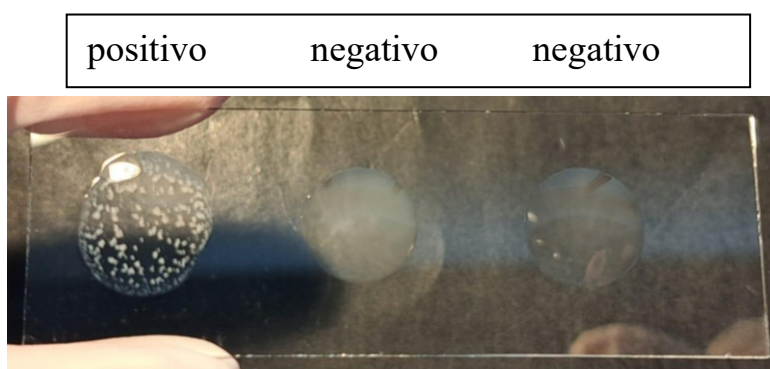


Figura 31 - Test di sieroagglutinazione su vetrino per la definizione degli antigeni somatici O eseguito su ceppi di *L. monocytogenes*. In ordine da sinistra verso destra l'utilizzo degli antisieri O VI, O VII e O VIII.

Per valutare l'espressione degli antigeni flagellari, però, è necessario prima eseguire una serie di passaggi culturali:

- Dalla coltura pura in TSYEA si inocula per infissione una colonia in una provetta contenente terreno BHI+0,25% agar e si incuba a 25°C per 24 ore, temperatura ottimale per favorire la mobilità del ceppo.



Figure 32 – Provette di terreno agarizzato BHI: a sinistra, immediatamente dopo essere stato seminato per infissione col ceppo di *L. monocytogenes*; a destra, dopo 24 ore dall'incubazione a 25°C.

- Passato il tempo di incubazione si preleva con un'ansa la coltura cresciuta più esternamente al sito di inoculo, così da selezionare i ceppi più mobili, e si inocula l'ansa nel terreno di crescita TSB. Segue una seconda incubazione alle medesime condizioni della prima.
- Successivamente si aliquota nei pozzetti a fondo a U di una piastra, la coltura da TSB e gli antisieri flagellari H-A, H-AB, H-C e H-D saggiati singolarmente. Un controllo negativo con la soluzione fisiologica (SF) e la coltura batterica viene utilizzato per individuare i ceppi autoagglutinanti. La piastra viene disposta per 2 ore a 50°C nel bagnetto termostato, trascorse le quali si esegue la lettura: la positività all'antisiero è data da un precipitato sul fondo del pozzetto (Figura 33).

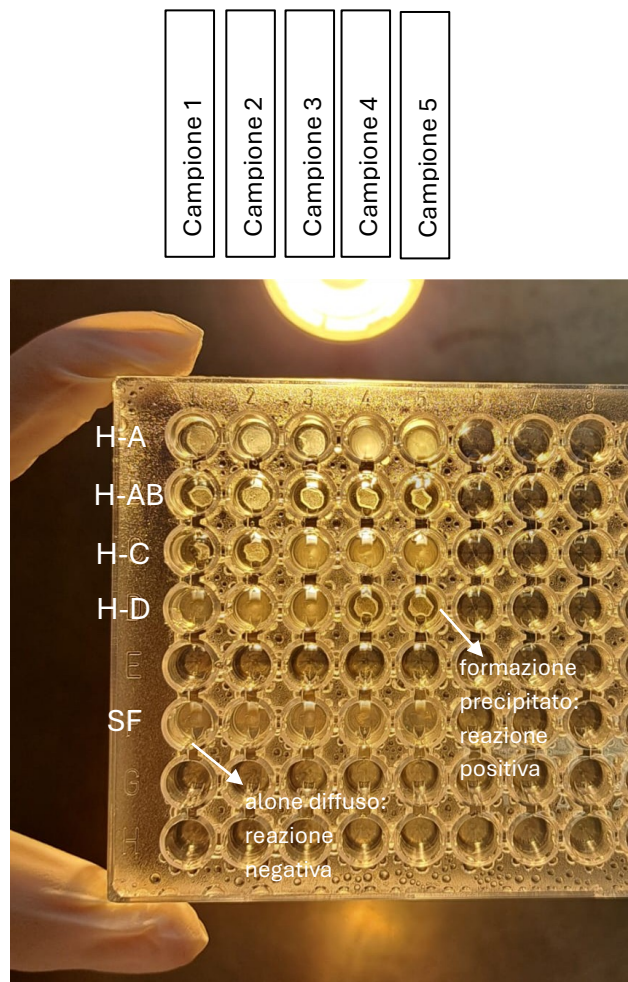


Figura 33 - Piastra da 96 pozzetti con fondo a U dove le prime 5 colonne sono state utilizzate per la definizione sierologica dell'antigene flagellare di 5 isolati diversi di *L. monocytogenes*.

Dalla combinazione dei risultati positivi dell'agglutinazione dell'antigene somatico e flagellare si risale al sierotipo attraverso lo schema mostrato in Tabella 4. La positività agli antigeni riportati tra parentesi non è obbligatoria. Come esempio, in Figura 34 è riportata la tipizzazione del sierotipo 1/2a.

Tabella 4 - Schema che permette di definire il sierotipo dei ceppi di *L. monocytogenes* in base all'esito delle reazioni immunologiche con gli antisieri precedentemente illustrati. (Nota: la positività all'antigene flagellare AB è riportata con la lettera B).

Sierotipo	Antigene O	Antigene H
1/2a	I, II, (III)	AB
1/2b	I, II, (III)	ABC
1/2c	I, II, (III)	BD
3a	II, (III), IV	AB
3b	II, (III), IV, (XII), (XIII)	ABC
3c	II, (III), IV, (XII), (XIII)	BD
4a	(III), (V), VII, IX	ABC
4ab	(III), V, VI, VII, IX, X	ABC
4b	(III), V, VI	ABC
4c	(III), V, VII	ABC
4d	(III), (V), VI, VIII	ABC
4e	(III), V, VI, (VIII), (IX)	ABC
7	(III), XII, XIII	ABC

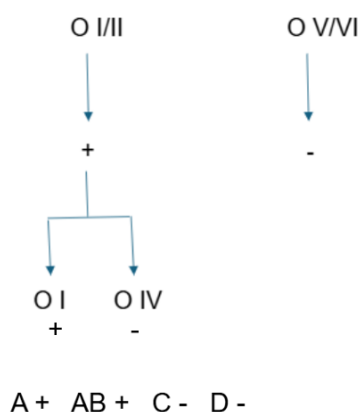


Figura 34 - Schema di tipizzazione con i rispettivi esiti per la definizione del sierotipo 1/2a.

3.1.4 Sierotipizzazione molecolare

I risultati che si ottengono dalla tipizzazione con metodo sierologico non sono sempre soddisfacenti, soprattutto nell'ambito della ripetibilità, richiedono diversi giorni per eseguire i vari passaggi culturali, l'analisi deve essere eseguita su ceppi freschi ed è una metodica costosa [2].

Per questo, grazie alla presenza di regioni specifiche sul genoma, è stata messa a punto una tecnica di classificazione molecolare di *L. monocytogenes* utilizzando il metodo PCR Multiplex

end-point con rilevazione dei prodotti d'amplificazione mediante separazione elettroforetica su gel di agarosio messa a punto dal laboratorio di sicurezza alimentare dell'ente francese ANSES. Ad oggi rappresenta il gold standard e permette di suddividere i ceppi in 5 sierogruppi molecolari: IIa (che comprende i sierotipi 1/2a e 3a), IIb (1/2b, 3b, 7), IIc (1/2c, 3c), IVa (4a, 4ab, 4c) e IVb (4b, 4d, 4e) [1]. Dal profilo di amplificazione non si ha la distinzione nei singoli sierotipi appartenenti alla stessa classe molecolare, ma i ceppi 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b rappresentano più del 95% degli isolati alimentari e clinici, con il sierotipo 4b che è il principale responsabile dei casi di listeriosi umana (più del 50%). Inoltre, i sierotipi 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4e, 4d e 7 sono molto rari negli alimenti e raramente segnalati come implicati nella listeriosi umana [2].

Nella procedura di sierotipizzazione molecolare si possono individuare 3 fasi:

1. Estrazione del DNA da colture pure su TSYEA
2. Amplificazione mediante PCR
3. Esecuzione e interpretazione dei risultati dell'elettroforesi

Estrazione del DNA

Per la purificazione del DNA si utilizza la metodica di estrazione che prevede l'utilizzo di Chelex-100, una resina in grado di chelare ioni bi- e tri-valenti come Mg^{2+} , cofattore essenziale per l'attività delle nucleasi. Si procede disperdendo una o due colonie batteriche in 100 μ l di Chelex-100, precedentemente disposto in una provetta da 1,5 ml. Segue una prima incubazione a 56°C per 30 minuti ed una seconda a 95°C per 15 minuti. Il calore rompe le membrane cellulari e il contenuto intracellulare viene rilasciato. Centrifugando ad una velocità di 5000 RCF per 5 minuti i detriti cellulari si depositano sul fondo della provetta e il DNA rimane in soluzione.

Amplificazione mediante PCR

I marcatori genetici amplificati con i rispettivi primer utilizzati sono indicati in Tabella 5.

Tabella 5 - Elenco dei primer impiegati e loro caratteristiche.

Gene target	primer	Sequenze (5'-3')
<i>prfA</i>	LIP1 LIP2	GAT ACA GAA ACA TCG GTT GGC GTG TAA TCT TGA TGC CATY CAG G
<i>prs</i>	PRS1 PRS2	GCT GAA GAG ATT GCG AAA GAA G CAA AGA AAC CTT GGA TTT GCG G
<i>lmo0737</i>	LMO0737 1 LMO0737 2	AGG GCT TCA AGG ACT TAC CC ACG ATT TCT GCT TGC CAT TC
<i>lmo1118</i>	LMO1118 1 LMO1118 2	AGG GGT CTT AAA TCC TGG AA CGG CTT GTT CGG CAT ACT TA
<i>orf2819</i>	ORF2819 1 ORF2819 2	AGC AAA ATG CCA AAA CTC GT CAT CAC TAA AGC CTC CCA TTG
<i>orf2110</i>	ORF2110 1 ORF2110 2	AGT GGA CAA TTG ATT GGT GAA CAT CCA TCC CTT ACT TTG GAC

A ciascun sierogruppo si associano amplificazioni di specifiche regioni geniche (Tabella 6):

Tabella 6 - Tabella esiti di amplificazione in relazione al sierogruppo di appartenenza

Regione del genoma	Dimensione attesa (bp)	Sierogruppo IIa	Sierogruppo IIb	Sierogruppo IIc	Sierogruppo IVa	Sierogruppo IVb	<i>Listeria non monocytogenes</i>
<i>lmo1118</i>	906 bp	-	-	+	-	-	-
<i>lmo0737</i>	691 bp	+	-	+	-	-	-
<i>orf2110</i>	597 bp	-	-	-	-	+	-
<i>orf2819</i>	471 bp	-	+	-	-	+	-
<i>prs</i>	370 bp	+	+	+	+	+	+
<i>PrfA</i>	274 bp	+	+	+	+	+	-

Una volta preparata la miscela di reazione, ne vengono ripartiti 23 µl in ciascun pozzetto della strip, a cui verranno aggiunti 2 µl del DNA da saggiare ottenendo un volume totale di 25 µl. Il programma di amplificazione è riportato in Tabella 7.

Tabella 7 - Programma di amplificazione.

FASE	TEMPERATURA(°C)	TEMPO	CICLI
Denaturazione iniziale	94°C	1'	1
Denaturazione	94°C	15"	35
Annealing	53°C	15"	35
Estensione	72°C	90"	35
Estensione finale	72°C	7'	1
Hold	4°C	∞	/

Esecuzione ed interpretazione dei risultati tramite elettroforesi

Essendo una PCR end-point per visualizzare i prodotti di amplificazione occorre eseguire una separazione elettroforetica in gel di agarosio al 2% impostando un campo elettrico di 110 Volt per 55 minuti.

Per una corretta lettura dei risultati vengono utilizzati:

- 5 controlli positivi. Corrispondono a 5 ceppi di riferimento, uno per ciascun sierogruppo. La corretta amplificazione di tutte le bande nei controlli serve ad escludere eventuali inibizioni.
- un controllo negativo dove il DNA è sostituito dall'acqua.

Caricando in un pozzetto un marcatore di pesi molecolari, si verifica la dimensione in paia di basi (bp) dei prodotti di amplificazione.

Il DNA non ha proprietà fluorescenti, ma si sfrutta un intercalante che associato alla macromolecola è in grado di assorbire specifiche lunghezze d'onda nell'UV ed emettere ad una lunghezza d'onda nel visibile (MIDORI Green con concentrazione iniziale 25000X). L'ultimo step è rappresentato dall'acquisizione dell'immagine. In Figura 35 è mostrata la corsa elettroforetica in gel d'agarosio degli ampliconi di 5 ceppi di *L. monocytogenes*, mentre in Figura 36 è mostrato il marcatore di pesi molecolari utilizzato (FastGene 100 bp DNA Marker).

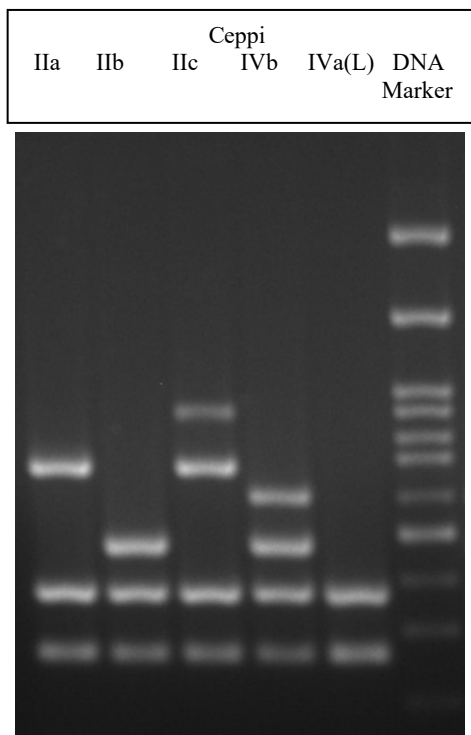


Figura 35 - Gel di agarosio dove è possibile apprezzare la separazione degli ampliconi di 5 ceppi di *L. monocytogenes*, uno per ciascun sierogruppo molecolare e il DNA Marker.

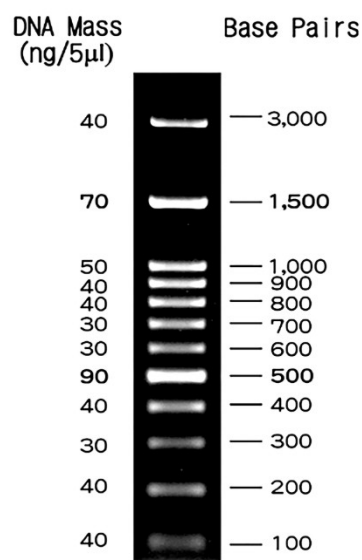


Figura 36 - DNA marker utilizzato nella separazione elettroforetica nel gel mostrato in Figura 35 [11].

Il numero e le dimensioni degli ampliconi tipici di ogni sierogruppo di *L. monocytogenes* sono riassunti in Tabella 8 mentre in Figura 37 è mostrato un gel d'agarosio con i profili molecolari.

Tabella 8 - Profili molecolari dei diversi sierogruppi di *L. monocytogenes* ottenuti dalla reazione di amplificazione.

Sierogruppo	Bande presenti					
IIa	274 bp	370 bp			691 bp	
IIb	274 bp	370 bp	471 bp			
IIc	274 bp	370 bp			691 bp	906 bp
IVa (L)	274 bp	370 bp				
IVb	274 bp	370 bp	471 bp	597 bp		

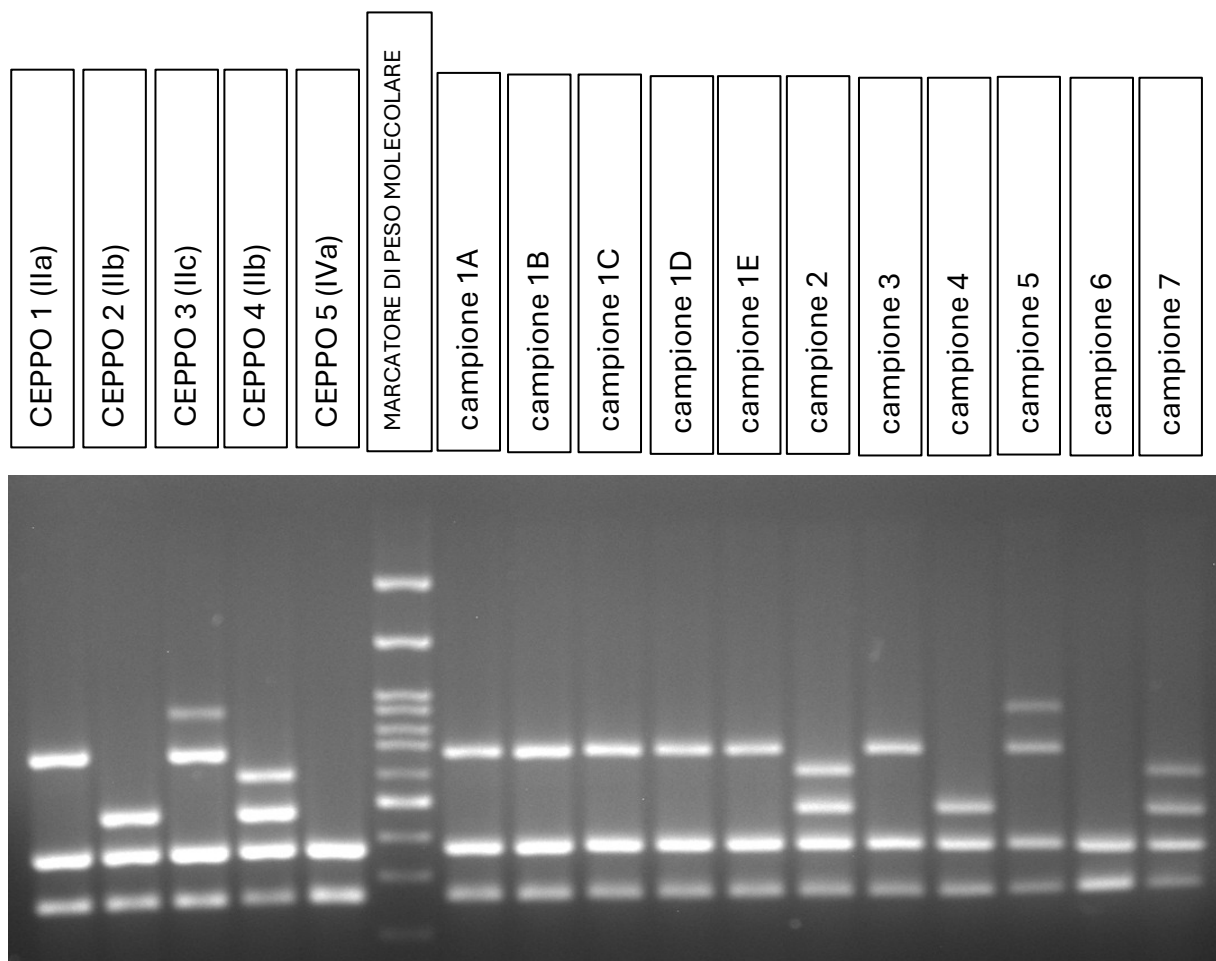


Figura 37 - Gel di agarosio dove sono stati caricati, da sinistra verso destra, i prodotti di PCR per i 5 diversi sierogruppi molecolari di riferimento di *L. monocytogenes*, il DNA Marker e i campioni da caratterizzare.

3.1.5 Sequenziamento WGS

Il Whole Genome Sequencing è una tecnica che permette di sequenziare l'intero genoma di un organismo e, quindi, di ottenere la sua sequenza nucleotidica completa. Può rappresentare l'ultimo step di un'analisi o, come nel caso della sorveglianza della Listeriosi, essere un passaggio necessario per condurre ulteriori indagini.

Le sequenze complete dei ceppi di *L. monocytogenes* vengono caricate su specifiche piattaforme bioinformatiche dove vengono sottoposte ad analisi genomiche per ottenere informazioni in merito a Lineage, Sequence Types (ST) e Clonal Complex (CC). I risultati ottenuti saranno poi oggetto di studi statistici, tra cui studi di correlazione, ai fini di approfondire le informazioni in possesso o anche per associare uno specifico ceppo batterico ai focolai di infezione alimentare.

La metodica può essere suddivisa in diverse fasi:

- Estrazione del DNA
- Allestimento della libreria genomica
- Sequenziamento
- Quality check dei dati prodotti dal sequenziatore
- Analisi bioinformatica dell'assemblaggio delle sequenze

Dopo aver verificato l'idoneità della sequenza, si procede con le analisi bioinformatiche per la definizione di:

- Lineage: ottenuto da analisi filogenetiche. Ad oggi si definiscono quattro gruppi principali (I, II, III, IV) dove al lineage I appartengono principalmente gli isolati clinici, mentre al lineage II i ceppi di origine alimentare o derivanti da tamponi effettuati in ambienti di produzione alimentare [30];
- Sequence Types (ST): ottenuto da analisi Multi Locus Sequence Type (MLST). Metodica che prevede l'analisi di 7 geni housekeeping e associa ad ogni profilo allelico uno specifico ST [30];
- Clonal Complex (CC): è rappresentato da un gruppo di ST che presentano caratteristiche genetiche simili [30].

Estrazione del DNA

La purificazione del DNA dai ceppi batterici viene eseguita attraverso l'utilizzo di QIAamp® DNA Mini Kit (QUIAGEN Italia), seguendo le indicazioni della casa produttrice.

Da una coltura pura in agar Sangue si preleva una piccola quantità di patina batterica con un'ansa sterile e si stempera in 180 µl di buffer ATL, addizionato con 20 µl di Proteinasi K. La provetta viene agitata con il vortex, per omogenizzare la sospensione, e successivamente in incubata nel termoblocco a 56°C per 90 minuti. Si aggiungono 4 µl di RNase A ad una concentrazione di 100 mg/ml e successivamente viene disposta nuovamente in agitazione nel vortex. Si aggiungono 200 µl di buffer AL, si agita con il vortex, per poi procedere con una incubazione a 70°C. Passati 10 minuti viene tolta la provetta dal termoblocco e si aggiungono 200 µl di etanolo. L'intera soluzione viene trasferita in una colonnina con membrana e centrifugata a 6000 giri per 1 minuto. Si effettua un lavaggio aggiungendo 500 µl di buffer AW1 nella colonnina e centrifugando a 20000 giri per 3 minuti. L'ultimo passaggio è

rappresentato dalla eluizione del DNA dalla membrana aggiungendo 200 µl di buffer AE con successiva centrifugazione a 6000 giri per 1 minuto (©QIAGEN 2018).

Il DNA eluito viene prima quantificato con Qubit e dopo diluito in modo da ottenere una concentrazione finale 1,8-2,8 ng/µl.

Preparazione delle librerie genomiche

Una libreria genomica è una raccolta di cloni di frammenti di DNA che, nel loro insieme, contengono l'intero genoma di un organismo.

Le librerie utilizzate per il WGS devono avere necessariamente due caratteristiche:

- Rappresentatività. Una libreria si dice rappresentativa quando contiene, in almeno una copia, tutte le possibili sequenze. Ogni porzione del genoma deve essere presente almeno in un frammento;
- Ridondanza, ovvero deve contenere molte copie della stessa porzione genomica.

Per la preparazione della libreria viene usato il kit Nextera XT Library Preparation (© 2015 Illumina, Inc 2013) e nella procedura possono essere definite 6 fasi:

- Tagmentazione genomica: La preparazione della libreria avviene per contemporanea frammentazione e successivo legame di Index Adapter (oligonucleotidi terminali). La frammentazione può essere fatta con enzimi o per sonicazione. In questo caso il kit utilizzato sfrutta l'attività di enzimi chiamati trasposasi che frammentano il DNA e in contemporanea aggiungono oligonucleotidi terminali (Figura 38 e 39). Questi sono costituiti da sequenze universali che vengono utilizzate per costruire dei primer per aggiungere gli adapter ai frammenti ottenuti.

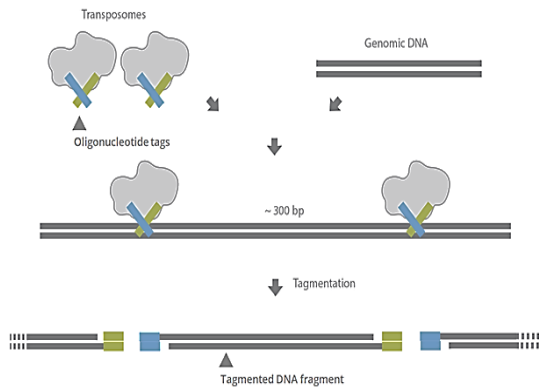


Figura 38 - Illustrazione sequenziale dell'attività delle trasposasi sul DNA [24].

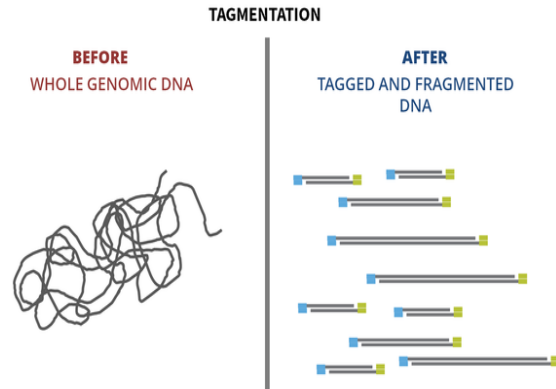


Figura 39 - A sinistra il DNA di partenza (integro), a destra il risultato dell'attività delle trasposasi (DNA frammentato) [24].

- **Indicizzazione:** si esegue una PCR a cicli ridotti (12 cicli) con l'uso di primer in cui una porzione è complementare all'oligonucleotide aggiunto, mentre un'altra porzione è rappresentata da un indice e un adattatore (Figura 40). Si sceglie una coppia di Index Adapter la cui combinazione sia unica per ciascun isolato in esame. L'indice serve per associare i frammenti di DNA ad uno specifico campione: tutte le sequenze che deriveranno dal campione 1 inizieranno con una sequenza specifica che sarà letta dal sequenziatore. Gli adattatori servono per la fase di sequenziamento vera e propria successiva alla preparazione della libreria.

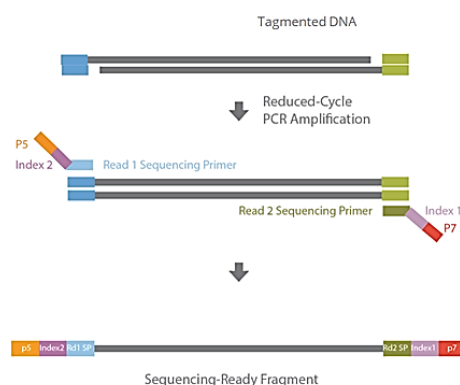


Figura 40 - Sequenzialmente: DNA tagmentato di partenza, appaiamento della coppia di Index Adapter e prodotto finale dell'indicizzazione [24].

- **Library Clean up:** al termine dell'indicizzazione si ottengono delle librerie di dimensioni diverse. Per ottenere la libreria genomica con i frammenti della lunghezza di nostro interesse viene eseguita una fase di pulizia con biglie magnetiche.
- **Quantificazione del DNA:** realizzata attraverso l'utilizzo del Qubit.

- Verifica della qualità della libreria: questo passaggio serve per verificare la dimensione e il grado di frammentazione. Vengono impiegati sistemi elettronici automatizzati ad alta risoluzione, come il sistema Bioanalyzer, oppure il sistema di elettroforesi capillare Qiaxcel (QIAGEN).
- Normalizzazione: si intende quel processo che permette di ottenere la stessa concentrazione di DNA in tutti i campioni che devono essere sottoposti a sequenziamento.

Più campioni saranno sequenziati contemporaneamente e per questo si procede con la creazione di un unico pool che contenga tutte le librerie: si prelevano 5 µl da ciascuna e si dispongono tutti in un'unica eppendorf da 1,5 ml. Dopo aver miscelato bene, in modo che sia omogeneo, si procede con un'ulteriore quantificazione per verificare che il pool abbia la concentrazione desiderata o, nel caso, diluire ulteriormente.

MiSeq Illumina

La libreria è pronta e può essere caricata nella macchina dove si esegue:

- amplificazione clonale
- sequenziamento

L'amplificazione clonale avviene su supporto solido rappresentato da una cella a flusso (flowcell). La scelta della cartuccia da utilizzare dipende dall'output di sequenziamento desiderato.

Si trasferiscono 600 µl del pool delle librerie precedentemente denaturato nel pozzetto "Load Sample", si carica la cartuccia nello strumento e si configura la corsa per poi avviarla.

Quality check (QC) dei dati prodotti dal sequenziatore

I dati ottenuti dal sequenziamento vengono sottoposti a un Quality check per garantire l'affidabilità dei risultati ottenuti da ulteriori analisi bioinformatiche effettuate sulle sequenze generate. Sequenze di bassa qualità possono portare a gravi errori di interpretazione dei risultati.

I parametri di qualità di base analizzati per una valutazione complessiva della seduta di sequenziamento sfruttando la tecnologia Illumina sono:

- Q30 (%): rappresenta la percentuale di chiamate di nucleotidi in una "run" con un Q score ≥ 30 . Q30 (%) deve essere maggiore o uguale a 75;

- Cluster density (K/mm²). Rappresenta la densità dei cluster, ovvero i gruppi clonali di frammenti di library in 1 mm² e il valore deve essere compreso tra 600 e 1600;
- Cluster Passing Filter (%). Rappresenta la percentuale di clusters che hanno passato il filtro, ovvero che rispettano specifiche caratteristiche di qualità per essere considerati affidabili. È accettabile se la percentuale è uguale o maggiore a 80.

I parametri di qualità per stabilire l'idoneità delle sequenze grezze per i singoli campioni sono:

- Numero totale, dimensioni (medie) e qualità media delle reads;
- Coverage $\geq 18X$. Espresso come (conta delle reads grezze*lunghezza delle reads)/dimensione totale del genoma o della sequenza in esame. Se il valore è minore di 15 è ritenuto non idoneo;
- Percentuale di basi non chiamate nelle reads <1%;
- Presenza di contaminazioni < 5%.

Analisi bioinformatiche dei dati: trimming delle sequenze grezze, assemblaggio de novo e QC dell'assemblaggio

Le sequenze grezze ritenute idonee vengono sottoposte a trimming, ovvero vengono rifinite eliminando gli adattatori e rimuovendo le reads, o parti di esse, che hanno una bassa qualità. Il processo prevede l'utilizzo di software dedicati, come Trimmomatics.

Vengono successivamente assemblate in sequenze continue più lunghe denominate contigs (assemblaggio *de novo*) attraverso tools di assemblaggio basati su DBG (De Bruijn graf), come SPAdes o Velvet. L'output prodotto è un file di testo in formato FASTA che contiene i contigs su cui si procede a verificare la qualità dell'assemblaggio con appositi tools.

3.1.6 Analisi bioinformatica sulle sequenze genomiche finite

Ottenute le sequenze genomiche, vengono applicate metodologie di analisi *in silico* per la determinazione di lineage, sequence type (ST) e clonal complex (CC) dei ceppi di *L. monocytogenes*. Questi parametri rappresentano i criteri di screening utilizzati sia nella piattaforma GenPat che nella piattaforma IRIDA ARIES, per identificare i ceppi su cui effettuare indagini epidemiologiche.

La tipizzazione molecolare mediante analisi delle sequenze genomiche si basa sulla metodologia MLST ovvero sul Multi-Locus Sequence Typing (MLST), dove si analizza un set altamente conservato di 7 geni interni essenziali chiamati geni housekeeping (sono geni

essenziali sempre attivi in tutte le cellule di un organismo, infatti codificano per proteine essenziali per la sopravvivenza di base e il mantenimento delle funzioni cellulari fondamentali) Un'evoluzione dell'MLST è il “core genome MLST” (cgMLST), che estende l'analisi ad un set di centinaia o migliaia di geni conservati presenti nell'intero genoma (il core genome) di un ceppo batterico o di una specie (ad es. per *L. monocytogenes* sono 1700 loci o geni circa, mentre per *Salmonella* sono circa 3.002 loci).

Per definire il Sequence Type, si determinano le sequenze di questi 7 frammenti di DNA e ad ogni sequenza unica trovata per un determinato gene, viene assegnato un numero identificativo detto allele; la combinazione dei 7 numeri allelici (ad esempio: 1-4-3-1-2-6-4) costituisce il profilo allelico del ceppo, che definisce in modo univoco il suo Sequence Type (ST) (es. ST-11, ST-258).

Mentre il Sequence Type (ST) definisce quindi un singolo profilo genetico, il Clonal Complex (CC) raggruppa una “famiglia” di ST geneticamente correlati, che discendono da un ceppo comune recente.

La caratterizzazione del CC viene fatta utilizzando algoritmi bioinformatici di clustering, che analizza tutti gli ST del database e li collega tra loro se differiscono per un solo gene su 7 (questo vale sia per *L. monocytogenes* che per *Salmonella*).

Il Clonal Complex prende il nome dall'ST founder (capostipite); ad esempio, il CC11 è il complesso clonale il cui capostipite (e membro più rappresentativo) è l'ST-11 e comprende l'ST-11 stesso più tutti gli ST strettamente derivati da esso. Per questo il CC può essere indicato con lo stesso numero o con un numero differente.

3.2 *Salmonella* spp.

Il genere *Salmonella* è sottoposto a grande attenzione visto che è tra le principali cause di intossicazione alimentare, per cui è fondamentale la sua ricerca nei campioni alimentari.

I serovar della sottospecie *enterica* e *bongori* sono definiti dalla loro formula antigenica. La loro caratterizzazione al CRRLm è realizzata attraverso l'applicazione di metodiche diverse in base all'origine del ceppo.

3.2.1 sieroagglutinazione antigene somatico O

Gli isolati veterinari di *Salmonella* spp., confermati attraverso la valutazione di una serie di attività biochimiche, sono sottoposti al CRRLm alla prova di sieroagglutinazione per la definizione del sierogruppo dell'antigene somatico O. Questa prevede una prima fase di screening con l'utilizzo di soluzione fisiologica (per escludere la presenza di ceppi autoagglutinanti e, quindi, falsi positivi) e antisieri polivalenti per pool di gruppi somatici O, successivamente si utilizzano antisieri per i gruppi somatici O specifici.

Si rileva, quindi, la presenza di specifici antigeni O sulla superficie cellulare. La reazione, come per il test di sieroagglutinazione di *L. monocytogenes*, consiste nel legame specifico tra l'anticorpo e l'antigene che, ad opportune concentrazioni, determina la formazione dell'immunocomplesso e la sua successiva precipitazione.

Per l'esecuzione si dispone una goccia di reattivo su un vetrino e con un'ansa sterile, si preleva una colonia isolata su un terreno non selettivo, come Nutrient agar, e la si disperde nell'antisiero. La reazione positiva è definita dalla formazione di strutture fioccosi, mentre l'esito negativo è dato da una opacità lattiginosa (Figura 41).

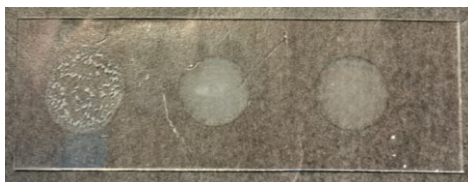


Figura 41 - Test di sieroagglutinazione su vetrino. Solo nel test a sinistra si osserva la formazione dell'immunocomplesso con la sua successiva precipitazione.

3.2.2 Tipizzazione molecolare

I ceppi di *Salmonella* isolati da matrice umana vengono sottoposti a tipizzazione attraverso un saggio multiplex-PCR Real Time semiautomatico. Si valuta, quindi, non l'espressione genica di antigeni di superficie, ma la variazione genetica di 21 loci nel genoma dei ceppi di *Salmonella*. La rilevazione dei prodotti di amplificazione è possibile grazie all'utilizzo di sonde a idrolisi (TaqMan) caratterizzate dalla presenza ad un'estremità di un fluoroforo e dall'altra estremità da una molecola quencher. Se nel genoma batterico è presente la sequenza complementare, la sonda si appaierà e verrà degradata dall'attività 5'-esonucleasica della DNA polimerasi con emissione di fluorescenza.

Dalla combinazione della presenza/assenza dei 21 loci si ottiene un profilo di amplificazione unico, definito genovar. Il software restituisce un serovar specifico se, consultando il dataset, trova il genovar corrispondente, altrimenti il risultato sarà il profilo genetico del ceppo.

Attraverso questa tecnologia è possibile identificare 105 serovars di *Salmonella*.

La pratica analitica prevede una prima fase di estrazione del DNA, in cui si preleva una colonia ben isolata con un prelevatore di colonie (Figura 42), si disperde in 200 µl di buffer di lisi e si dispone la provetta in un termoblocco a 98°C per 10 minuti.

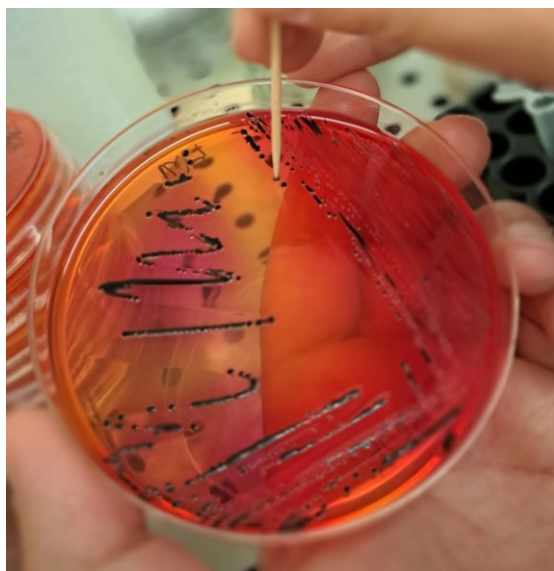


Figura 42 - L'operatore seleziona una colonia isolata di *Salmonella* spp. su XLD.

Successivamente si trasferiscono 140 µl di lisato grezzo in un'altra provetta contenente 35 µl di mix, quest'ultima viene fornita già completa di tutti i componenti necessari per la reazione. Si pipetta per almeno tre volte e si dispensano 25 µl in 6 provette della striscia reattiva per la PCR (Figura 43).

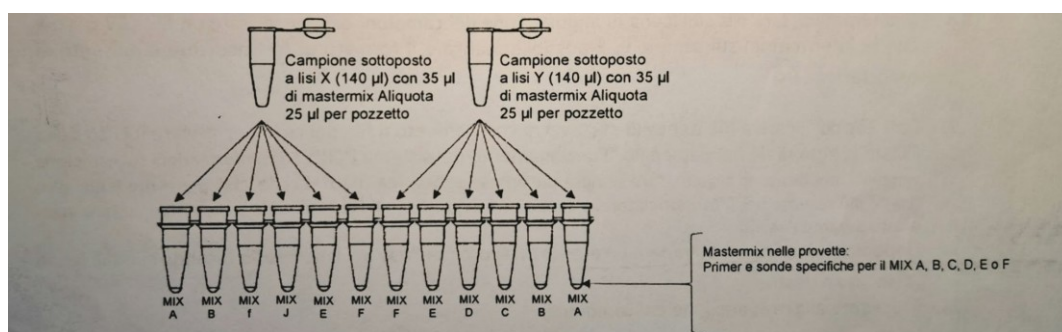


Figura 43 - Schema di distribuzione del lisato grezzo nelle provette della strip di caricamento.

Si dispone il coperchio a ciascuna striscia e le streap vengono disposte nel termociclatore. Al termine del ciclo il software restituisce, nel caso di risultato positivo per *Salmonella* il corrispondente serovar (se presente) o il genovar, altrimenti "assenza di *Salmonella*".

3.3 *Campylobacter spp.*

La campylobatteriosi è una malattia infettiva causata dal batterio Gram negativo *Campylobacter spp.* Descritta negli anni Cinquanta come rara batteriemia nelle persone immuno-compromesse, nel 1972 è stata individuata come causa di malattie diarroiche. La maggior parte delle infezioni (circa il 90%) è provocata dalle specie *C. jejuni* e *C. coli*, mentre meno frequenti sono quelle causate dalle specie *C. lari*, *C. fetus* e *C. upsaliensis*.

La campylobatteriosi è una delle malattie batteriche gastrointestinali più diffuse al mondo e il suo tasso di incidenza ha superato in alcuni Paesi europei quello relativo alle salmonellosi non tifoidee [41].

3.3.1 Caratterizzazione molecolare di specie

Sui ceppi umani o veterinari confermati di *Campylobacter spp.* si esegue una multiplex PCR end-point per la definizione della specie che prevede l'amplificazione di specifiche regioni genomiche attraverso l'utilizzo di quattro coppie di primer (Tabella 9).

Tabella 9 – Primer utilizzati e le loro caratteristiche.

Specie (gene)	Primer	Sequenza	Dimensioni ampliconi (bp)
<i>Campylobacter jejuni</i> (<i>hipO</i>)	CJF (forward)	ACT TCT TTA TTG CTT GCT GC	323
	CJR (reverse)	GCC ACA ACA AGT AAA GAA GC	
<i>Campylobacter coli</i> (<i>glyA</i>)	CCF (forward)	GTA AAA CCA AAG CTT ATC GTG	126
	CCR (reverse)	TCC AGC AAT GTG TGC AAT G	
<i>Campylobacter lari</i> (<i>cpn60</i>)	JH0015 (forward)	TCT GCA AAT TCA GAT GAG AAA A	180
	JH0016 (reverse)	TTT TTC AGT ATT TGT AAT GAA ATA TGG	
<i>Campylobacter spp.</i> (23S rRNA)	23SF (forward)	TAT ACC GGT AAG GAG TGC TGG AG	650
	23SR (reverse)	ATC AAT TAA CCT TCG AGC ACC G	

La procedura analitica prevede tre diverse fasi:

- Estrazione del DNA
- Amplificazione
- Separazione elettroforetica su gel di agarosio

Estrazione del DNA

La purificazione degli acidi nucleici può essere realizzata attraverso la semplice bollitura. Si prelevano con un'ansa sterile 1-2 colonie da coltura pura su terreno nutriente, come agar Sangue Columbia, e si stemperano in 100 µl di acqua distillata sterile in una provetta da 1,5 ml. Si dispone la eppendorf nel termoaggitatore per 5 minuti a 95°C, trascorsi i quali si centrifuga a 8000 RPF per almeno 3 minuti.

Amplificazione mediante PCR

Si prepara la miscela di reazione contenente tutti i reagenti necessari per far avvenire la polimerizzazione e si dispensano 22,5 µl in ciascun pozzetto, dove verranno aggiunti 2,5 µl di DNA.

Vengono utilizzati controlli positivi (uno per ciascuna specie che può essere identificata per verificare che la reazione sia avvenuta correttamente) e un controllo negativo dove il DNA è sostituito con acqua distillata (per escludere la presenza di eventuali contaminazioni e, quindi, falsi positivi).

Terminato il caricamento, le strip vengono inserite in un termociclatore e si imposta il programma di amplificazione (Tabella 10).

Tabella 10 - Profilo termico di amplificazione.

Fase	Temperatura	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	95 °C	3'	1
Denaturazione	95 °C	30"	30
Annealing	59 °C	30"	
Estensione	72 °C	30"	
Estensione finale	72 °C	7'	1
Hold	4 °C	∞	

Analisi elettroforetica

Per la visualizzazione dei risultati occorre effettuare una separazione elettroforetica degli ampliconi.

Viene preparato un gel di agarosio al 1,5% a cui vengono aggiunti 5 µl di intercalante (MIDORI Green con concentrazione iniziale 25000X), una molecola che legatasi al DNA ha la capacità di assorbire specifiche lunghezze d'onda nell'UV ed emetterne nello spettro del visibile.

Ai campioni amplificati si aggiungono 5 µl di Loading buffer e si caricano nei pozzetti del gel 10 µl di campione. Per la corretta identificazione delle bande viene utilizzato un DNA ladder (FastGene 100 bp DNA Marker, vedi paragrafo 3.1.4) composto da diversi frammenti di dimensioni note. Si imposta un campo elettrico con differenza di potenziale di 110 V per 55 minuti e al termine della corsa si procede ad acquisire l'immagine esponendo il gel a raggi UV.

In Tabella 11 sono riportati i profili genomici che caratterizzano le diverse specie di *Campylobacter* mentre in Figura 34 è mostrata la corsa elettroforetica in gel d'agarosio degli ampliconi di 3 ceppi di riferimento di *Campylobacter* termotolleranti e del campione da caratterizzare.

Tabella 11- Schema degli specifici ampliconi ottenuti dalla reazione di PCR per le specie *Campylobacter* [34].

Specie	Ampliconi			
	CCF/CCR	JH0015/JH0016	CJF/CJR	23SF/23SR
<i>Campylobacter</i> spp.				650 bp
<i>C. jejuni</i>			323 bp	650 bp
<i>C. lari</i>		180 bp		650 bp
<i>C. coli</i>	126 bp			650 bp

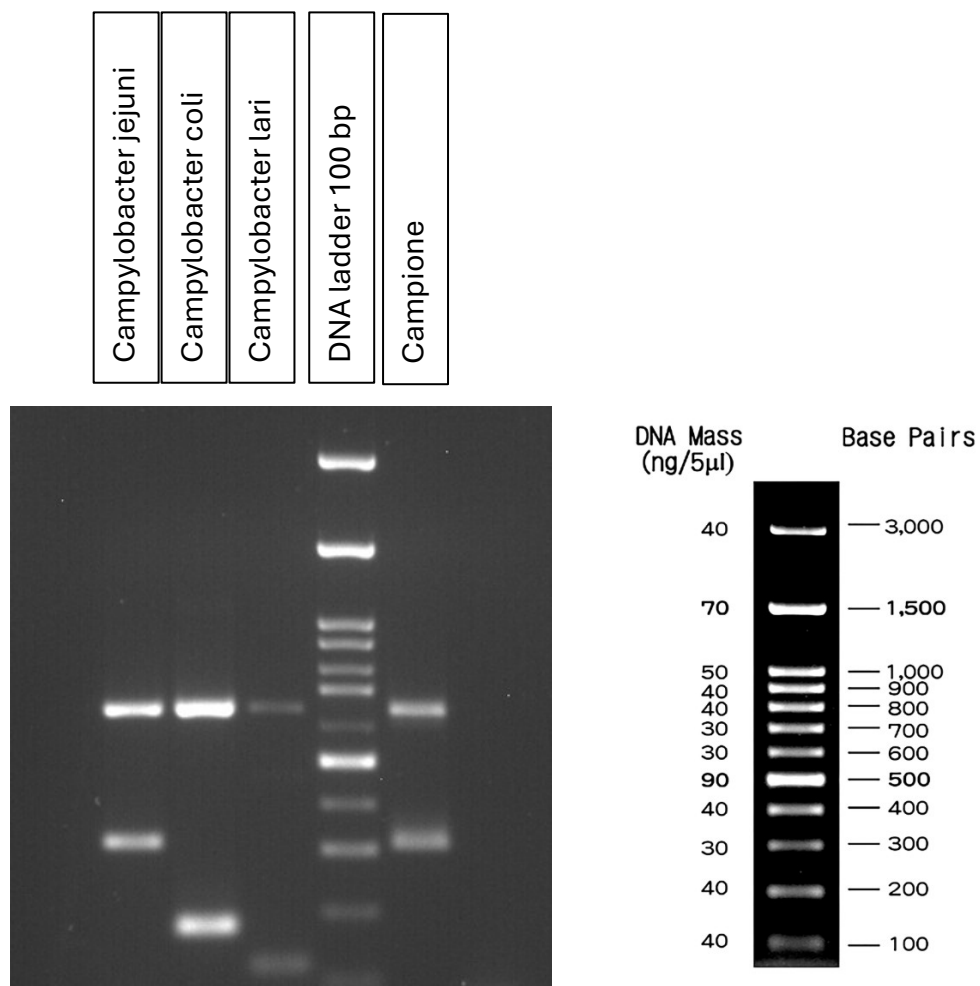


Figura 44 – A sinistra, gel di agarosio in cui si apprezza la separazione elettroforetica, da sinistra verso destra, degli ampliconi di 3 ceppi di riferimento di *Campylobacter* termotolleranti, del DNA Marker per la corretta identificazione delle bande e del campione da caratterizzare. A destra il marcatore molecolare utilizzato [11].

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Dal 16 marzo 2026 al 10 settembre 2026 presso il CRRLm sono stati tipizzati complessivamente 153 ceppi batterici (Tabella 12).

Ceppi gestiti dal CRRLm nel 2026	Totali	Provenienza umana	Provenienza veterinaria
<i>Listeria monocytogenes</i>	26	10	16
<i>Salmonella</i> spp.	123	89	34
<i>Campylobacter</i> spp.	4	4	/
Totali	153		

Tabella 12 - Schema riassuntivo sulla totalità dei ceppi gestiti.

Come anticipato nel paragrafo 1.2.3 i campioni umani derivano da isolati di presidi ospedalieri, policlinici universitari della Regione Toscana e laboratori privati nell'ambito regionale di competenza.

I campioni veterinari comprendono isolati provenienti da matrici di origine:

- alimentare: isolati nei laboratori delle sedi territoriali dell'IZSLT, in ambito di controllo ufficiale (PRA, PNAA, UVAC, PIF e MTA) o autocontrollo, laboratori di sanità pubblica e laboratori privati operanti nel settore delle produzioni alimentari;
- animale: isolati nei laboratori di diagnostica generale delle sedi territoriali dell'IZSLT;
- ambientale: isolati in ambito di controllo ufficiale, delle verifiche di sanificazione delle aree di produzione alimentare e macellazione, da alimenti o campioni ambientali prelevati durante le indagini di MTA, da autocontrollo e da laboratori privati.

4.1 *Listeria monocytogenes*

4.1.1 Analisi di prevalenza

Da una prima analisi di prevalenza sulla totalità dei ceppi indipendentemente dalla matrice di origine dell'isolamento, sono stati estrapolati i risultati presentati in Tabella 13 e in Figura 45.

Tabella 13 – Schema riassuntivo della totalità degli isolati di *L. monocytogenes* caratterizzati al Centro

Sierogruppo	Casi	Percentuale
IIa	10	38,46%
IIb	1	3,84%
IIc	6	23,08%
IVa	0	0%
IVb	9	34,62%
totale	26	/

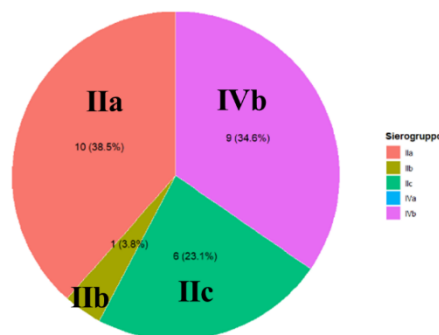


Figura 45 – Grafico a torta delle percentuali riportate in Tabella 13.

Dai campioni clinici umani la maggior parte delle manifestazioni patologiche è a carico del sierogruppo IIa seguito dal sierogruppo IVb (Tabella 14 e Figura 46).

Tabella 14 – Schema dei dati degli isolati umani di *L. monocytogenes* analizzati al Centro.

Sierogruppo	Casi umani	Percentuale
IIa	5	50%
IIb	1	10%
IIc	1	10%
IVa	0	0%
IVb	3	30%
totale	10	/

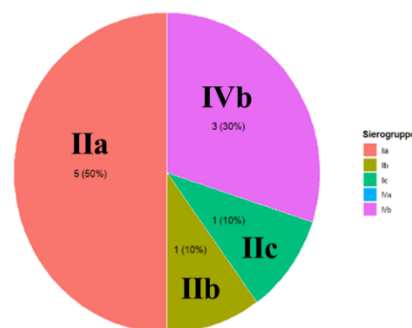


Figura 46 – Grafico a torta delle percentuali riportate in Tabella 14.

Se si confrontano i dati umani con quelli veterinari si osserva che:

- nel contesto veterinario non si ha la netta prevalenza del sierogruppo IIa;
- il sierogruppo IIb, di minore isolamento nell'uomo, non riporta neanche un caso;
- il sierogruppo IIc è di maggiore riscontro negli isolati di origine veterinaria (31,25%) rispetto a quelli di origine umana (10%);
- il sierogruppo IVa non è stato riscontrato in nessun isolato, in accordo con il contesto dei campioni umani;
- il sierogruppo IVb ha una rappresentanza simile nei due contesti.

Tabella 15 – Schema di distribuzione dei sierogruppi degli isolati veterinari di *L. monocytogenes*.

Sierogruppo	Casi veterinari	Percentuale
IIa	5	31,25%
IIb	0	0%
IIc	5	31,25%
IVa	0	0%
IVb	6	37,5%
totale	16	/

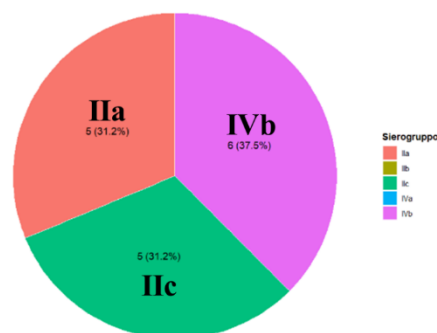


Figura 47 - Grafico a torta per la rappresentazione delle percentuali di distribuzione riportate in Tabella 15.

Da tale confronto si evidenzia che i tre sistemi (umano, animale e ambiente) sono strettamente connessi tra loro e la salute dell'uomo dipende dal benessere dell'intero ecosistema. L'alternazione di uno dei tre si riflette inequivocabilmente sugli altri, per questo si parla di ottica One Health, ovvero "Unica Salute". Nel caso della Listeriosi, come per altre patologie riconducibili ad agenti zoonotici, la trasmissione avviene per via alimentare e il serbatoio naturale del genere *Listeria* è l'ambiente stesso. I vegetali e gli animali possono essere contaminati/infettati dall'ambiente, così le materie prime derivanti possono trasmettere *L. monocytogenes* all'uomo.

Un aspetto importante da considerare per la corretta interpretazione dei risultati è che questo studio si riferisce a 7 mesi di sorveglianza, da marzo a settembre 2026, quindi non ad un anno solare, ma un periodo comunque rappresentativo del reale andamento delle zoonosi. Inoltre, grazie alle misure di prevenzione adottate dall'industria alimentare e al piano di sorveglianza nazionale e sovranazionale *L. monocytogenes* è di minore riscontro nel settore veterinario rispetto agli altri patogeni e di conseguenza, anche nel contesto della salute umana è di meno frequente isolamento, sebbene la malattia sia in continuo aumento negli anni e tra le tossinfezioni sia quella più grave in quanto associata a un elevato tasso di ospedalizzazione e decessi.

I risultati ottenuti derivano dall'analisi dei dati in merito al sierogruppo. Se si vuole valutare la prevalenza dei sierotipi, i risultati in percentuale sarebbero i medesimi riferiti, però, agli unici sierotipi isolati: 1/2a (IIa), 1/2b (IIb), 1/2c (IIc) e 4b (IVb).

4.1.2 Analisi bioinformatiche con funzione “ReportTree”

La sorveglianza della Listeriosi nel contesto nazionale ha come punti focali la caratterizzazione genomica e la trasmissione di dati completi ed esaustivi attraverso una piattaforma informatica che si relaziona con network nazionali e sovranazionali.

Tutti gli isolati infatti sono sottoposti a caratterizzazione genomica e a un’indagine epidemiologica molecolare, per valutare la circolazione dei ceppi sul territorio e l’identificazione di cluster attraverso la comparazione del profilo genomico degli isolati e la valutazione della presenza degli isolati con profilo compatibile.

Come anticipato nel paragrafo 1.2.6, l’analisi cgMLST si basa sulla valutazione delle differenze alleliche delle sequenze genomiche dei ceppi di *L. monocytogenes* dove l’oggetto dell’analisi sono i 1748 geni del core genome. Due o più ceppi sono considerati genomicamente correlati se appartengono allo stesso cluster ovvero se la distanza allelica non è superiore a sette.

L’analisi bioinformatica dei ceppi di origine veterinaria viene effettuata sulla piattaforma GenPat dove vengono caricate le sequenze genomiche ottenute con tecnologia WGS, fase analitica che però richiede diverso tempo. Per questo motivo nel presente studio tale analisi di correlazione è stata applicata a casi di positività che risalgono all’anno 2025 in modo tale da avere tutte le sequenze necessarie a disposizione. La funzione utilizzata sulla piattaforma è “ReportTree”, che permette la visualizzazione grafica delle distanze alleliche (DA) in relazione ai profili allelici ottenuti da analisi cgMLST. L’algoritmo utilizzato per la realizzazione dell’albero è "Minimum Spanning Tree". Ogni nodo rappresenta un campione, dove campioni diversi vengono distinti con colori diversi, e i rami definiscono con diretta proporzionalità la DA.

Durante le indagini per MTA, nel caso di listeriosi nell’uomo, gli uffici di igiene pubblica delle ASL attivano una procedura d’emergenza e di sorveglianza del territorio, che prevede l’attivazione dei dipartimenti di prevenzione veterinaria che effettuano sopralluoghi, in base ad indicazioni epidemiologiche derivanti dai questionari somministrati ai pazienti o a loro familiari, sulle abitudini alimentari nel periodo precedente la sintomatologia (per Listeriosi almeno 30 giorni), nell’ambito dei quali sono prelevate matrici alimentari e/o campioni ambientali per poter individuare la fonte della contaminazione e in quale fase della lavorazione o confezionamento è avvenuta la contaminazione del prodotto.

Di seguito vengono riportati alcuni esempi dove sono state confrontate le sequenze dei ceppi isolati nella matrice alimentare e ceppi isolati dai tamponi effettuati nel sito di produzione per stabilire l'eventuale correlazione.

Caso industria alimentare M.: il 21 maggio 2025 sono state prelevate al sito di produzione 5 unità campionarie di un lotto di salame, dove nella u.c. 2 è stata rilevata la presenza di *L. monocytogenes* ed è stato isolato un ceppo appartenente al sierogruppo IIc. Il 5 giugno 2025 l'ASL effettua numerosi tamponi ambientali all'industria alimentare, da cui sono state isolate una *L. monocytogenes* sierogruppo IIa dal tampone effettuato nel tritacarne e una *L. innocua* da un tampone effettuato su un pozzetto locale lavorazione.

Sui due ceppi appartenenti alla specie *monocytogenes* (isolati dal salame e dal tampone) viene lanciata su GenPat la funzione ReportTree che costruisce alberi di distanze alleliche utilizzando i risultati del cgMLST per i dati in input. Come risultato viene restituita l'immagine mostrata in Figura 48.

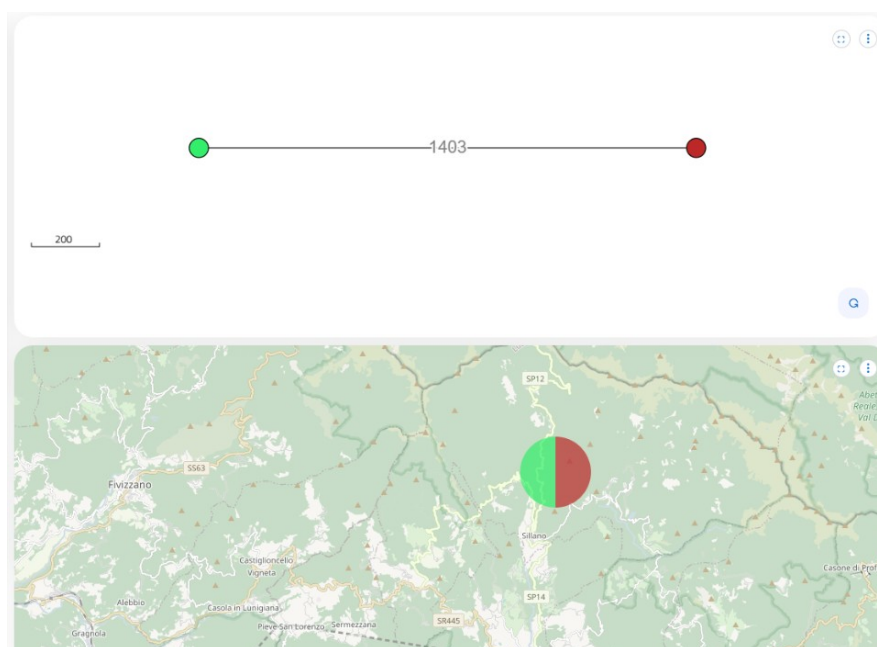


Figura 48 - Albero di distanze alleliche tra i due isolati di *L. monocytogenes* con riferimento geografico dei siti di prelievo.

La differenza allelica è di 1403, quindi si può escludere una stretta correlazione tra questi due isolati ed affermare che nel sito di produzione era presente una co-contaminazione di almeno due ceppi diversi di *L. monocytogenes*. Il risultato era già prevedibile considerando l'appartenenza a sierogruppi diversi e confrontando i valori relativi al Clonal Complex (CC) e

al Sequence Type (ST) dei due isolati che corrispondevano a CC9, ST9 per il ceppo isolato dal prodotto alimentare e CC31, ST31 per il ceppo isolato dal tampone prelevato nel tritacarne.

Una situazione simile è stata riscontrata nel 2024 in un'industria F.: il 4 dicembre 2024 è stato prelevato un campione di salame prodotto con carne suina da cui successivamente è stato isolato un ceppo di *L. monocytogenes* appartenente al sierogruppo IIb e con parametri di screening CC3 ST3. Dal successivo tampone effettuato dal personale dell'ASL su un tavolo di lavorazione (prelevato in data 17 dicembre 2024) è stato isolato un ceppo di *L. monocytogenes* sierogruppo IIc CC9 ST580. In questo caso, come in quello precedente, basta confrontare il sierogruppo per poter concludere dicendo che i due ceppi appartengono a cluster diversi. A dimostrazione di tale tesi è stata lanciata la pipeline "ReportTree" dalla piattaforma GenPat e la distanza allelica ottenuta è di 1725 (Figura 49). Le considerazioni sono le medesime del caso precedente, ovvero nel locale di produzione era presente una co-contaminazione di almeno due ceppi diversi di *L. monocytogenes*.

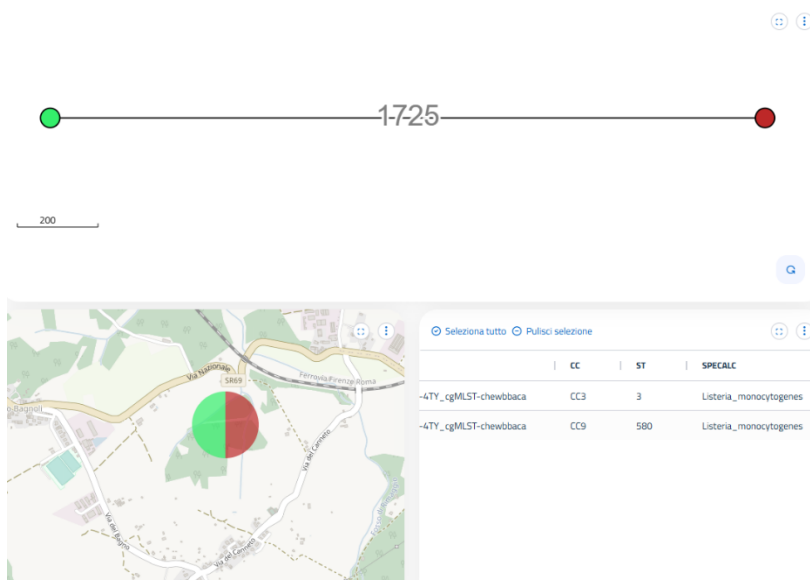


Figura 49 - In alto albero di distanze alleliche tra i due ceppi di *L. monocytogenes* analizzati; in basso a sinistra i riferimenti geografici del luogo di prelievo e sulla destra i dati associati ai campioni.

Risulta molto interessante riportare le numerose positività per *L. monocytogenes* riscontrate in un'altra industria alimentare che indicheremo con le sigle B.G.

In ordine cronologico vengono elencate le matrici con la data di prelievo e il sierogruppo dell'isolato:

- A: Tartare di salmone prelevata il 11.11.2024 con sierogruppo IIa;

- **B**: Saku di salmone prelevato il 15.5.2025 con sierogruppo IIc;
- **C**: Tartare di salmone prelevata l'8.7.2025 con sierogruppo IIa, ma le sequenze non sono state ancora caricate;
- **D**: Tampone nella macchina di spellatura per salmone prelevato il 25.7.2025, con sierogruppo IIc;
- **E**: Tartare di pesce spada prelevata il 6.10.2025 con sierogruppo IIa, ma le sequenze non sono state ancora caricate;
- **F**: Tartare di pesce spada prelevata il 7.10.2025 con sierogruppo IIa;
- **G**: Tampone di superficie prelevato il 27.10.2025 con sierogruppo IIa.

Dalle sequenze a disposizione è stata lanciata l'analisi ReportTree che ha portato ai seguenti risultati (Figura 50):

- i ceppi **A** e **F** risultano appartenenti allo stesso cluster con una distanza allelica di 3, e quindi non superiore a 7. Situazione da attenzionare considerando la distanza temporale dei due isolamenti;
- i ceppi **B** e **D** presentano una distanza allelica di 7, per cui anch'essi sono considerati appartenenti allo stesso cluster;
- il ceppo **G** non sembra essere associato a nessuno dei due cluster sopracitati.

Si può concludere affermando che nel sito di produzione era presente una co-contaminazione di almeno tre cluster diversi e che ci sia la possibilità che uno non sia mai stato debellato dall'11 novembre 2024 al 7 ottobre 2025 (ceppi **A** e **F**), a dimostrazione della persistenza del genere *Listeria* sulle superfici e la capacità di resistere e adattarsi a diversi fattori di stress. Un'altra interpretazione dei risultati può essere quella di ipotizzare che il ceppo **F** sia stato reintrodotta al sito di produzione.

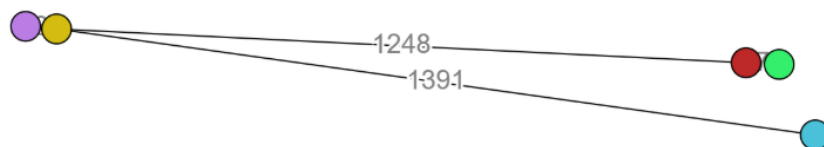


Figura 50 - Albero di distanze alleliche dei cinque campioni isolati da matrici alimentari e tamponi ambientali prelevati nel medesimo sito di produzione.

4.2 *Salmonella*

4.2.1 Analisi di prevalenza

I ceppi di *Salmonella* veterinari sono stati sottoposti a saggi di sieroagglutinazione antigenica per la loro caratterizzazione. La matrice dell'isolamento è per la quasi totalità dei casi rappresentata da carne di pollame e spugnette su carcassa animale con il serovar più frequente rappresentato da *S. infantis* 6, 7 : r : 1, 5 (prevalenza del 64,70%) (Tabella 16 e Figura 51). Solo un ceppo, isolato dall'intestino di una pecora, è risultato non tipizzabile con tale metodo, ma comunque con reazione positiva per l'antisiero polivalente per conferma dell'appartenenza al pool di gruppi: I, J, K, M, N, O, P.

Tabella 16 - Distribuzione dei serovar degli isolati di *Salmonella* spp. veterinari in relazione al numero di casi e le corrispondenti percentuali.

Serovar	Casi	Percentuali
<i>Salmonella infantis</i> 6, 7 : r : 1, 5	22	64,70%
<i>Salmonella typhimurium monofasica</i> 4, 5, 12 : i : -	3	8,83%
<i>Salmonella Derby</i> 4, 12 : f, g : -	3	8,83%
Presenza antigeni flagellari r e 1, 5	2	5,88%
<i>Salmonella enterica</i> sottospecie <i>diarizonae</i>	1	2,94%
<i>Salmonella senftenber</i>	1	2,94%
<i>Salmonella Napoli</i> 9, 12 : l, z13 : e, n, x	1	2,94%
Non tipizzabile sierologicamente	1	2,94%

Distribuzione dei sierovar di Salmonella

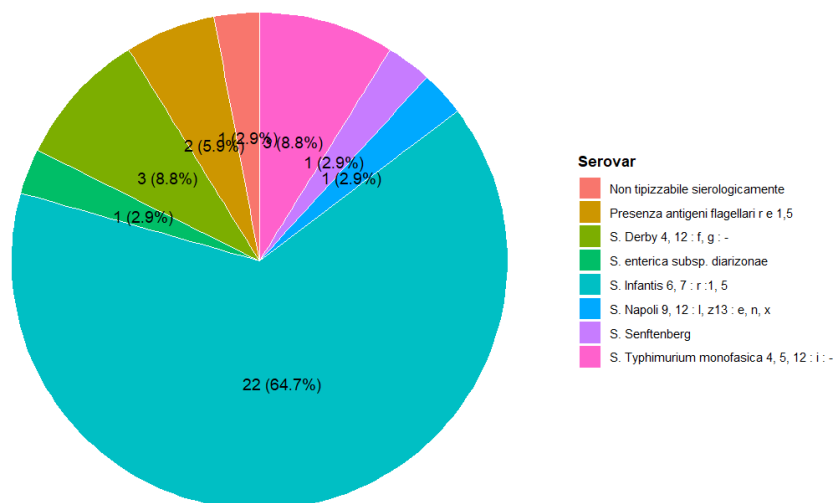


Figura 51 - Grafico a torta delle percentuali di distribuzione degli isolati di *Salmonella* spp. veterinari riportati in Tabella 16.

Dalla caratterizzazione dei ceppi di *Salmonella* spp. originari da campioni umani (89, di cui il 90% da feci) si può osservare che è presente una maggiore eterogeneità con la definizione di 30 diversi profili di identificazione tra serovar e genovar (Figura 52):

- 21 *Salmonella* *TYPHIMURIUM MONOPHASIC* (23,6%);
- 9 *Salmonella* *ENTERITIDIS* (10,11%);
- 9 *Salmonella* *INFANTIS* (10,11%);
- 8 *Salmonella* *Napoli* 9, 12 : l, z13 : e, n, x (8,99%);
- 7 *Salmonella* *TYPHIMURIUM* (7,87%);
- 4 GENOVAR: CRWJT1 (4,5%);
- 3 GENOVAR: CXTPW1 (3,37%);
- Altri 28 ceppi appartenenti a 23 serovars/genovars che non figurano in più di due pazienti; tra questi *Salmonella* *Derby* (2,25%).

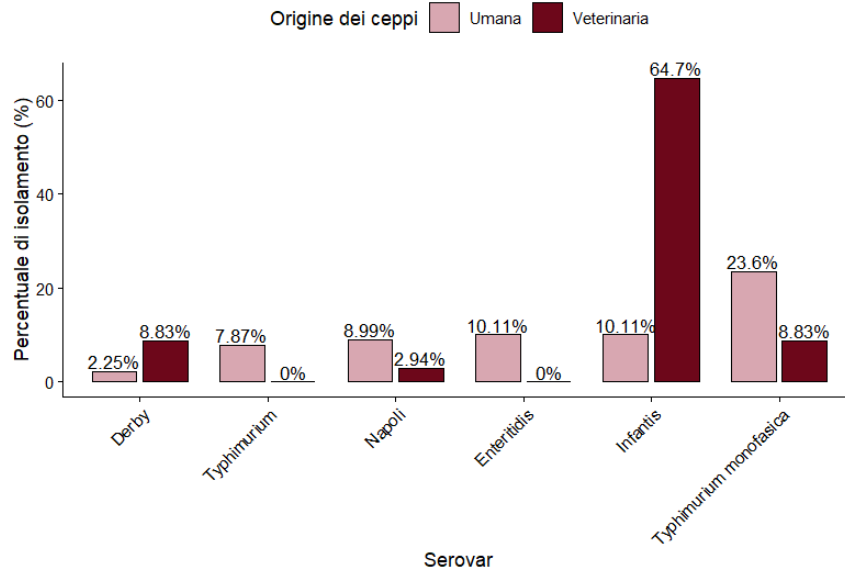


Figura 52 - Istogramma che confronta le percentuali di isolamento dei principali serovar di *Salmonella* spp. isolati da matrice veterinaria e umana.

Una più immediata interpretazione può essere effettuata se si confrontano le percentuali di incidenza dei principali serovar isolati nei ceppi umani e veterinari:

- i dati sono conformi al generale profilo epidemiologico europeo in cui i principali responsabili di salmonellosi nell'uomo (*typhimurium*, *typhimurium monofasica*, *infantis* ed *enteritidis*) sono anche i principali serovar isolati nei casi di MTA in Toscana, nonostante nei campioni veterinari non sia stata riscontrata la presenza dei serovar *S. enteritidis* e *S. typhimurium*;
- *Salmonella typhimurium monofasica* risulta essere la prima in termini di frequenza ad essere isolata nei casi di salmonellosi nella regione Toscana;
- *Salmonella infantis* predomina negli isolati veterinari, dove la matrice contaminata è soprattutto la carne di pollame.

L'ISS riferisce che alcune categorie di persone come:

- individui con più di 65 anni;
- bambini al di sotto dei 5 anni;
- individui con sistema immunitario indebolito a causa di malattie come tumori, diabete, malattie del fegato o dei reni, infezione da HIV/AIDS, alcolismo;
- persone che fanno uso di farmaci antiacidi o che hanno subito trattamenti di chemioterapia o radioterapia;

- donne in gravidanza

hanno un rischio maggiore di essere colpite da una tossinfezione alimentare e, quando ciò accade, di sviluppare la malattia in forma grave [42].

Non avendo a disposizione informazioni in merito allo stato clinico e al trattamento farmacologico, si può restringere l'analisi analizzando l'unico parametro a disposizione: l'età del paziente (Tabella 17).

Tabella 17 - Numero di casi dei pazienti affetti da Salmonellosi classificati in relazione alle fasce d'età.

Fascia d'età pazienti	Casi
0-5	20
5-10	9
10-20	9
20-30	5
30-40	3
40-50	3
50-60	9
60-65	3
>65	28

I dati ottenuti sono in perfetto accordo con gli studi su base nazionale effettuati dall'ISS relativamente alle fasce di età più a rischio. La visualizzazione grafica dei risultati è disponibile in Figura 53, dove per una corretta costruzione dell'istogramma sono state accorpate le fasce 0-5 anni e 5-10 anni.

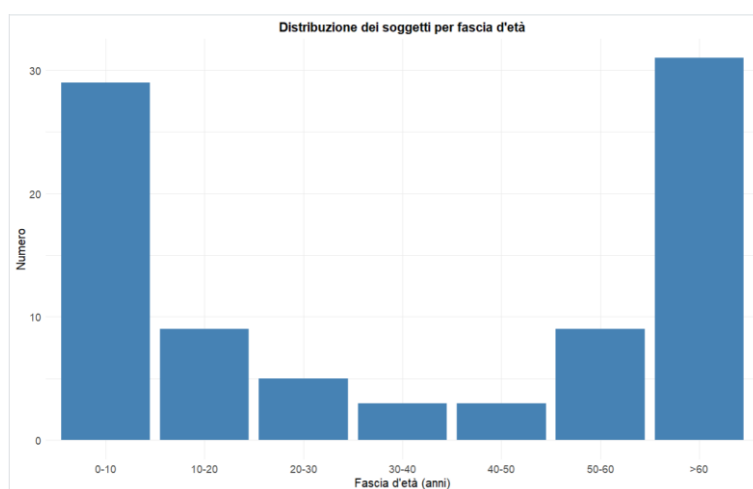


Figura 53 - Istogramma di frequenza in riferimento al numero di pazienti affetti da salmonellosi in relazione alla fascia d'età, dati riportati nella Tabella 17.

5. CONCLUSIONI

Il Centro di Riferimento Regionale per *L. monocytogenes* opera sul territorio regionale secondo un modello di sorveglianza integrato per patogeni di origine alimentare e infezioni umane correlate, secondo un approccio One Health.

Il flusso di lavoro è organizzato secondo una rete locale di scambio di informazioni e isolati che coinvolge tante strutture locali, ospedali pubblici e privati, laboratori IZS, per poi confluire in centri specialistici regionali, tra cui lo stesso CRRLm e nazionali, come il Laboratori Nazionali di Riferenza per i vari patogeni. La sinergia di tutti i componenti di questo sistema permette la raccolta di informazioni epidemiologiche a livello nazionale.

In questo contesto il CRRLm riveste un ruolo centrale perché, in primo luogo, riceve e caratterizza ceppi di patogeni isolati nell'ambito della Regione Toscana, sottoponendoli successivamente a sequenziamento WGS, in collaborazione con altri laboratori specialistici dell'IZSLT, quindi carica le informazioni ad essi associate (sia dati analitici che metadati) su reti e piattaforme informatiche nazionali dedicate alla raccolta e diffusione dei dati di agenti zoonotici. In questo modo alimenta i sistemi informativi e contribuisce al flusso di dati su cui saranno effettuate indagini epidemiologiche nazionali ed europee.

Le tecniche molecolari consentono quindi lo studio dell'epidemiologia delle infezioni con un approccio integrato rispetto ai metodi tradizionali, fornendo strategie più accurate di caratterizzazione dei microrganismi patogeni, in grado di stabilire i livelli di clonalità e tracciabilità dei microrganismi isolati oltre che all'identificazione e alla tipizzazione di specie dei microrganismi patogeni.

La genomica dei patogeni e il modello di sorveglianza delle malattie come descritto in parte in questo studio, ci consente di seguire le dinamiche della circolazione dei ceppi sul territorio sia in modo puntuale, per la pronta identificazione di possibili focolai, sia retrospettivamente permettendo di identificare focolai persistenti e la relativa dimensione territoriale, di mettere in campo misure per mitigare l'impatto di focolai identificati precocemente e di comprendere i meccanismi che permettono la persistenza di ceppi di *L. monocytogenes* e degli altri patogeni a trasmissione alimentare. Il tutto con un approccio One Health per l'integrazione dei dati genomici ed epidemiologici provenienti da diversi domini sanitari: umano, alimentare, animale e ambientale.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Fritsch L, Schmidt RS, Marti E. *Listeria monocytogenes*: Genomic characterization of persistent strains historically isolated from cheese processing facilities. *International Journal of Food Microbiology*. 2026, 453: 111734.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2026.111734>.
- [2] Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, 42: 3819-3822. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.8.3819-3822.2004>
- [3] Kathariou S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection*. 2002, 65(11):1811-1829.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.11.1811>.
- [4] Osek J, Wiczorek K. *Listeria monocytogenes* - How this pathogen uses its virulence mechanisms to infect the hosts. *Pathogens*. 2022, 11(12):1491. doi: 10.3390/pathogens11121491. PMID: 36558825; PMCID: PMC9783847.
- [5] Singh R, Jamieson A, Cresswell P. GILT is a critical host factor for *Listeria monocytogenes* infection. *Nature*. 2008, 455:1244–1247. <https://doi.org/10.1038/nature07344>.
- [6] Camejo A, Carvalho F, Reis O, Leitão E, Sousa S, Cabanes D. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence*, 2011, 2(5):379–394. <https://doi.org/10.4161/viru.2.5.17703>
- [7] Hof H. History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2003, 35(3):199–202. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(02\)00471-6](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(02)00471-6)
- [8] Conly J, Johnston B. *Listeria*: A persistent food-borne pathogen. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2008, 19(5):327-328. doi: 10.1155/2008/702565. PMID: 19436470; PMCID: PMC2606629.
- [9] Normativa Alimentare®, Salmonella, di cosa si tratta e l'incidenza nel settore alimentare, 29 ottobre 2021, consultato il 17 settembre 2026.
<https://normativaalimentare.it/news/salmonella-di-cosa-si-tratta-e-lincidenza-nel-settore-alimentare>

- [10] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale". Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes*. <https://lnr.izs.it/listeria/>.
- [11] NIPPON Genetics Europe, n.d. *FastGene® 100 bp DNA Marker*. https://www.nippongenetics.eu/app/uploads/2017/01/MWD100_FG-100bp-DNA-Marker_TDS-1.pdf
- [12] European Food Safety Authority. (2026) Biological monitoring of zoonoses. <https://www.efsa.europa.eu/en/data-report/biological-monitoring-zoonoses>.
- [13] Microbiologia Italia. (s.d.). *Listeria monocytogenes*. <https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/listeria-monocytogenes/>.
- [14] Tankeshwar A. *Listeria monocytogenes*: Properties, virulence factors, pathogenesis, and lab diagnosis. Microbe Online; 2026. <https://microbeonline.com/listeria-monocytogenes-pathogenesis-lab-diagnosis/>.
- [15] EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2021. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. EFSA Journal. 2021, 19(12):6971. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
- [16] Quereda JJ, Morón-García A, Palacios-Gorba C, Dessaux C, García-Del Portillo F, Pucciarelli MG, Ortega AD. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: A trip from environmental to medical microbiology. Virulence. 2021, 12(1):2509-2545. doi: 10.1080/21505594.2021.1975526. PMID: 34612177; PMCID: PMC8496543.
- [17] Stavru F, Palmer AE, Wang C, Youle RJ, Cossart P. Atypical mitochondrial fission upon bacterial infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 110(40):16003-16003. doi: 10.1073/pnas.1315784110. Epub 2013 Sep 16. PMID: 24043775; PMCID: PMC3791707.
- [18] University of Nebraska–Lincoln. (2024). *Listeria monocytogenes*. UNL Food. <https://food.unl.edu/article/listeria-monocytogenes/>
- [19] Commissione Europea. (2026). Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione, del 15 novembre 2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari (testo consolidato al 1° luglio 2026). EUR-Lex. EUR-Lex.

[20] UNI. (2017). UNI EN ISO 11290-1:2017. Microbiologia della catena alimentare – Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. – Parte 1: Metodo per la ricerca. Ente Italiano di Normazione.

[20] UNI. (2017). UNI EN ISO 11290-2:2017. Microbiologia della catena alimentare – Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. – Parte 2: Metodo per la conta. Ente Italiano di Normazione.

[21] Commissione Europea. (2024). Regolamento (UE) 2024/2895 della Commissione, del 20 novembre 2024, che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 per quanto riguarda *Listeria monocytogenes*. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 2024/2895, 21 novembre 2024. EUR-Lex

[22] Commissione Europea. (2024). Regolamento di esecuzione (UE) 2024/2463 della Commissione, del 12 settembre 2024, che stabilisce i metodi di analisi applicabili ai controlli ufficiali effettuati per verificare la conformità degli operatori del settore alimentare al regolamento (CE) n. 2073/2005. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 2024/2463, 13 settembre 2024.

[23] Commissione Europea. (2025). Regolamento di esecuzione (UE) 2025/179 della Commissione, del 31 gennaio 2025, relativo alla raccolta e alla trasmissione di dati analitici molecolari nel quadro delle indagini epidemiologiche sui focolai di tossinfezione alimentare in conformità alla direttiva 2003/99/CE del Parlamento europeo e del Consiglio. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 2025/179, 3 febbraio 2025.

[24] Salamat E. DNA Sequencing: Illumina Workflow Part-2 (DNA Tagmentation, Amplification, and Cleanup). UPCVM Disease Profiling Project. 2018 Feb 22. <https://upcvmda-pl480.weebly.com/educational-articles/dna-sequencing-illumina-workflow-part-2-dna-tagmentation-amplification-and-cleanup>

[25] EURL *Listeria monocytogenes*, ANSES, 2017. SOP. Molecular serotyping of *Listeria monocytogenes*: determination of the serogroup. Maisons-Alfort, France: Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail.

[26] Gasperetti L. IZSLT-UOC Toscana Nord. Malattie Trasmesse da Alimenti in Toscana: attività dei Laboratori del Sistema Integrato e del Centro di Riferimento Regionale. Evento organizzato da IZSLT presso la sede di Firenze il 7 ottobre 2025.

- [27] Pan Y, Breidt P, Kathariou S. Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed-culture biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009; 75:5846-5846.
- [28] Carpentier B, Cerf O. Review -- Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*. 2011; 145:1-8.
- [29] Eurofins. (s.d.). Detection of *Listeria monocytogenes*. Eurofins Food Testing. Consultato da Eurofins Food Testing – Detection of *Listeria monocytogenes*. <https://www.eurofins.in/food-testing/blog/detection-of-listeria-monocytogenes/>
- [30] Fotopoulou ET, Jenkins C, Barker CR, Painset A, Didelot X, Simbo A, Douglas A, Godbole G, Jorgensen F, Gharbia S, McLauchlin J. Genomic epidemiology of the clinically dominant clonal complex 1 in the *Listeria monocytogenes* population in the UK. *Microbial Genomics*. 2024,10(1):001155. doi: 10.1099/mgen.0.001155. PMID: 38165396; PMCID: PMC10868620.
- [31] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" (IZSAM), Sistema informativo per la Sorveglianza Epidemiologica degli Agenti Patogeni di origine alimentare (SEAP).
- [32] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" (IZS Teramo), Centro di Referenza Nazionale per le sequenze genomiche. <https://www.izs.it/IZS/Centri-di-Referenza/CRN-Sequenze-Genomiche>
- [33] ISO (2014) ISO/TR 6579-3:2014. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 3: Guidance for serotyping of *Salmonella serovars*. Geneva: International Organization for Standardization.
- [34] ISO (2017) ISO 10272-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 1: Detection method. Geneva: International Organization for Standardization.
- [35] Piattaforma GenPat, Wiki. (2026, 25 agosto). *ReporTree (cgMLST)*. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale". URL consultato il 10 ottobre 2026 su https://genpat.izs.it/wiki/it/Run_analyses/multi/gene-by-gene-based-clustering/reportree.html

[36] Regione Toscana, Decreto dirigenziale n. 27056 del 23 dicembre 2025, “Aggiornamento delle Linee Guida per la corretta gestione delle malattie veicolate da alimenti e della relativa modulistica operativa”, Allegato A, 2025.

[37] Parlamento Europeo e Consiglio dell’Unione Europea, Direttiva 2003/99/CE del 17 novembre 2003 sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, GU L 325 del 12 dicembre 2003, Allegato I, parte A.

[38] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri, UOC Toscana Nord (Pisa), disponibile all’indirizzo <https://www.izslt.it/le-sedi/uoc-toscana-nord-pisa>

[39] Regione Toscana – Giunta regionale, Deliberazione 27 giugno 2022, n. 734, Firenze, 2022.

[40] Commissione Europea (2025). Regolamento di esecuzione (UE) 2025/179 della Commissione, del 31 gennaio 2025, relativo alla raccolta e alla trasmissione di dati analitici molecolari nel quadro delle indagini epidemiologiche sui focolai di tossinfezione alimentare in conformità alla direttiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, GU L, 2025/179, 3 febbraio 2025.

[41] Istituto Superiore di Sanità – EpiCentro, *Campylobacter*. <https://www.epicentro.iss.it/campylobacter/>

[42] Istituto Superiore di Sanità (ISS). Infezione alimentare/Tossinfezione alimentare. ISSalute, 6 agosto 2018, ultimo aggiornamento 26 marzo 2026. <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/i/infezione-alimentare-tossinfezione-alimentare>

[43] Jajere SM. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. Veterinary World. 2019, 12(4):504-521. doi: 10.14202/vetworld.2019.504-521.

[44] Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana – CREP. (2021). Rapporto regionale sulla sorveglianza delle reti Enter-Net ed Enter-Vet: Triennio 2018-2020. Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana. <https://www.izslt.it/archivio-/rapporto-regionale-sulla-sorveglianza-delle-reti-enter-net-ed-enter-vet-2018-2020.html>

[45] Knijn A. (2024). IRIDA-ARIES, una risorsa chiave in Italia per la sorveglianza genomica One Health delle malattie infettive e il suo impiego nella sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare. *Nota dell'Istituto Superiore di Sanità*. 2024, 37(9):8–12.

[46] Goulet V, King LA, Vaillant V, de Valk H. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infectious Diseases*. 2013; 13(11): 1-1. doi: 10.1186/1471-2334-13-11. PMID: 23305174; PMCID: PMC3562139.

[47] Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010; 16(1):17-17. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x. PMID: 20002687.

RINGRAZIAMENTI

Professoressa De Rossi, La ringrazio sinceramente per essersi fatta carico del ruolo di mia relatrice e per aver seguito con attenzione e disponibilità la stesura di questa tesi. La Sua costante reperibilità e la Sua disponibilità mi hanno permesso di raggiungere questo importante obiettivo con serenità. Già durante le lezioni di Microbiologia Alimentare avevo avuto modo di apprezzare la Sua preparazione e la passione che dedica al Suo lavoro. Il Professore Pastoni manifestava spesso la profonda stima che nutriva nei Suoi confronti e oggi non posso che condividere pienamente il Suo giudizio.

Professore Pastoni, Lei è stato molto più di un insegnante, è stato una guida e un porto sicuro. Forse non l'ho mai ringraziata abbastanza per tutto l'aiuto ed il conforto che mi ha dato in questo anno. Non sono mai stata una persona con le idee chiare sul mio futuro, ma Lei ha illuminato in me interessi che io neanche pensavo di avere. Porterò con me il bagaglio di ogni Suo insegnamento, non solo accademico, ma soprattutto di vita. Le prometto che tutto il tempo che mi ha dedicato non sarà stato vano. Sono stata poco fortunata per il poco tempo avuto a disposizione, ma grata alla vita per averLa incontrata.

Estendo il mio ringraziamento a tutto il personale che lavora presso la sede di Pisa dell'IZSLT: grazie per l'ospitalità e il supporto che mi avete manifestato e che vi contraddistingue. Durante questo percorso ho trovato sempre persone competenti e disponibili, pronte ad aiutarmi e a condividere le loro conoscenze.