



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”



Tesi di Dottorato

INNOVATIVE STRATEGIE DI LOTTA CONTRO I PATOGENI DI
ORIGINE ALIMENTARE: NUOVE PROSPETTIVE PER
L'INDUSTRIA ALIMENTARE

Coordinatore

Ch.mo Prof
Giuseppe Cringoli

Candidato

Dott.ssa
Rossella Festa

Tutor

Ch.mo Prof.
Aniello Anastasio

INDICE

CAPITOLO 1 ABITUDINI ALIMENTARI E RISCHIO ZONOSI	3
1.1 EVOLUZIONE DEI TREND DI CONSUMO ALIMENTARE	4
1.2 I DATI EPIDEMIOLOGICI.....	6
1.2.1 Salmonella spp.....	7
1.2.2 Listeria monocytogenes.....	9
1.2.3 Staphylococcus aureus.....	11
CAPITOLO 2 L’AZIENDA PARTNER DEL DOTTORATO INDUSTRIALE. 12	
2.1 GRANCARNI SRL	13
2.1.1 I locali – Stabilimento di Pontelatone (prov. CE)	14
2.1.2 Il ciclo operativo.....	17
2.2 ATTIVITÀ SVOLTA DURANTE IL PERIODO AZIENDALE.....	20
2.3 PRINCIPI DI SANIFICAZIONE NELL’INDUSTRIA ALIMENTARE.....	22
2.3.1 Il piano di sanificazione.....	23
2.3.2 Monitoraggio e validazione del piano di sanificazione	26
2.4 PROCEDURE DI SANIFICAZIONE AZIENDALI	27
2.4.1 Procedura straordinaria di sanificazione con glutaraldeide.....	28
CAPITOLO 3 LA RESISTENZA BATTERICA AI BIOCIDI	30
3.1 RESISTENZA BATTERICA AI DISINFETTANTI CHIMICI.....	31
3.1.1 Meccanismi di resistenza intrinseca	32
3.1.2 Meccanismi di resistenza acquisita	34
3.1.3 Fenomeni di cross-resistenza.....	36
3.2 IL BIOFILM.....	39
3.2.1 Struttura del biofilm	40
3.2.2 Sviluppo del biofilm.....	41
3.2.3 Biofilm e meccanismi di resistenza batterica	44
3.2.4 Biofilm nell’industria alimentare - innovative strategie di intervento	47
CAPITOLO 4 SCOPO DELLA TESI.....	50
CAPITOLO 5 DISEGNO SPERIMENTALE E RISULTATI.....	52
FASE 1	54
5.1 I PEPTIDI ANTIMICROBICI	54
5.1.1 Meccanismo d’azione.....	55
5.1.2 AMP IDR-1018	57

5.1.3	Studio in silico AMP PEP1	58
FASE 2	60
5.2	VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA E ANTIBIOFILM DI AMP PEP1 vs S. AUREUS.	60
5.2.1	Materiali e Metodi	60
5.2.2	Risultati e Discussione	64
FASE 3	70
5.3	VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA E ANTIBIOFILM DI AMP PEP1 vs SALMONELLA SPP.	70
5.3.1	Materiali e Metodi	70
5.3.2	Risultati e Discussione	75
FASE 4	82
5.4	VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DI NANOBIOCOMPLESSI PEP1-AuNPs	82
5.4.1	Materiali e Metodi	82
5.4.2	Risultati e Discussione	85
CAPITOLO 6	CONCLUSIONI.....	91
BIBLIOGRAFIA	94
SITOGRAFIA	118
FONTI NORMATIVE	119

INDICE DELLE FIGURE

Fig. 1.1 Mercato della carne rossa e rosa, 2019.	4
Fig. 1.2 Mercato della carne bianca, 2019.....	5
Fig. 1.3 Principali prodotti alimentari/mangimi/MOCA notificati dall'Italia.....	7
Fig. 1.4 Monitoraggio di Salmonella spp. in carne e prodotti derivati, 2018.....	9
Fig. 2.1 Trend fatturato e utile aziendale. Dati pubblici.....	13
Fig. 2.2 Planimetria dello stabilimento di Pontelatone (CE).....	16
Fig. 2.3 Diagramma di flusso del ciclo operativo aziendale	19
Fig. 2.4 Attrezzatura per il trattamento con nebbia secca.	29
Fig. 3.1 Rappresentazione schematica delle fasi dello sviluppo del biofilm batterico.....	42
Fig. 5.1 Le fasi dell'attività sperimentale.....	53
Fig. 5.2 Modelli di permeabilizzazione della membrana batterica.	56
Fig. 5.3 Meccanismi d'azione di AMPs su bersagli intracellulari.	57
Fig. 5.4 Capacità di inibizione della produzione di biofilm di PEP1 vs S. aureus.....	65
Fig. 5.5 Attività di eradicazione di PEP1 su biofilm preformato di S. aureus.	67
Fig. 5.6 Biofilm di S. aureus. Immagini SEM.....	68
Fig. 5.7 Danno cellulare. Immagine SEM.....	69
Fig. 5.8 MIC e MBC di PEP1 vs S. enterica. Distribuzione dei dei valori.	76
Fig. 5.9 Efficacia anti-biofilm di PEP1 vs S. enterica.....	80
Fig. 5.10 Coniugazione di PEP1 con AuNPs	83
Fig. 5.11 Attività biocida di PEP1-AuNPs vs L. monocytogenes.....	87
Fig. 5.12 Attività battericida di PEP1-AuNPs vs S. Typhimurium.....	89

INDICE DELLE TABELLE

Tab. 1.1 Prevalenza di Salmonella spp. nelle principali categorie alimentari (2014-2018).....	8
Tab. 1.2 Principali categorie di alimenti RTE campionate nell'Eurozona (2014-2018).....	10
Tab. 2.1 Esempio di procedura di sanificazione.....	25
Tab. 3.1 Fattori che condizionano lo sviluppo di un biofilm microbico.	43
Tab. 5.1 Origine dei ceppi di Salmonella enterica e prove programmate.	71
Tab. 5.2 Valori MIC e MBC di PEP1 vs S. enterica.	77
Tab. 5.3 Valori di ΔOD_{630nm} di biofilm di S. enterica.....	79

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

AMP	Antimicrobial Peptide
ATCC	American Type Culture Collection
AuNPs	Nanoparticelle D'oro
BIC	Concentrazione Inibente Il Biofilm
BPW	Buffered Peptone Water
C&D	Cleaning And Disinfection
CD	Dicroismo Circolare
CE	Comunità Europea
CECT	Colección Española De Cultivos Tipo
DM	Decreto Ministeriale
ECDC	European Centre For Disease Prevention And Control
eDNA	Extracellular DNA
EFSA	European Food Safety Authority
EPS	Esopolisaccaridi
GDO	Grande Distribuzione Organizzata
GHP	Good Hygiene Practices
GMP	Good Manufacturing Practices
GPA	Good Agricultural Practice
HACCP	Hazard Analysis And Critical Control Point
LPS	Lipopolisaccaride
MAR	Multiple Antibiotic Resistance
MBC	Concentrazione Minima Battericida
MBEC	Concentrazione Minima Di Eradicazione Del Biofilm
MBIC	Concentrazione Minima Di Inibizione Del Biofilm
MDR	Multidrug-Resistant
MHB	Muller Hinton Broth
MIC	Concentrazione Minima Inibente
MOCA	Materiali E Oggetti A Contatto Con Gli Alimenti
MRSA	Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus
MSSA	Methicillin-Sensitive Staphylococcus Aureus
MTA	Malattia A Trasmissione Alimentare
NPs	Nanoparticles
NRL	Laboratorio Di Referenza Nazionale
OA	Origine Animale
OD	Densità Ottica
ON	Overnight
OSA	Operatore Del Settore Alimentare
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PDV	Punto Di Vendita

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

PRP	Programmi Di Prerequisiti
QS	Quorum Sensing
RASFF	Rapid Alert System For Food And Feed
R&D	Research And Development
RPM	Rotazioni Per Minuto
RTC	Ready To Cook
RTE	Ready To Eat
SEM	Microscopia Elettronica A Scansione
TEM	Microscopia Elettronica A Trasmissione
TFA	Acido Trifluoroacetico
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UE	Unione Europea
UFC	Unità Formanti Colonie
UTA	Unità Trattamento Aria

Abstract

La Commissione europea afferma che “un numero sempre crescente di consumatori attribuisce maggiore importanza alla qualità dei prodotti alimentari nella loro dieta piuttosto che alla quantità”. La valutazione del grado di sicurezza di un alimento, basata su rischi microbiologici o chimici, è uno dei cardini della politica comunitaria, tesa a rendere il consumatore consapevole delle scelte fatte.

Molti agenti responsabili di Malattie a trasmissione alimentare (MTA), come *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*, possono facilmente produrre biofilm, costituendo un problema di sicurezza alimentare e, conseguentemente, di salute pubblica. I biofilm batterici sui piani di lavorazione degli alimenti, infatti, possono rappresentare fonti critiche di contaminazione, essendo più resistenti alle procedure di pulizia e disinfezione.

Nell'industria alimentare, la sanitizzazione degli ambienti di lavoro e delle superfici a contatto con gli alimenti avviene normalmente attraverso l'utilizzo di composti chimici. Questo approccio, oltre che essere impattante per l'ambiente, può promuovere la resistenza batterica e non rivelarsi del tutto efficace nell'eradicazione del biofilm.

Negli ultimi anni, nell'ottica di un minor utilizzo di sostanze chimiche nelle fasi di detersione e disinfezione, si sta focalizzando l'attenzione su sostanze antibatteriche di nuova generazione come i peptidi antimicrobici (AMPs). Tali molecole fanno parte del sistema immunitario innato degli organismi superiori e rappresentano la prima linea di difesa contro numerosi agenti patogeni. La scarsa specificità li rende potenzialmente attivi a concentrazioni relativamente basse contro un largo spettro di agenti microbici e quindi interessanti per le molteplici possibili applicazioni.

Scopo della tesi è stato la valutazione dell'attività antimicrobica e anti-biofilm di una molecola di nuova sintesi, appartenente al gruppo dei peptidi antimicrobici naturali (AMPs) e denominata PEP1. Questo AMP, ottenuto per sostituzione amminoacidica da IDR 1018 (derivato dalla bactenecina bovina), ha rivelato una significativa efficienza battericida (MBC 10 μ M) e di prevenzione del biofilm (MBIC 50 μ M) contro un ceppo ATCC di riferimento di *Listeria monocytogenes* e una notevole stabilità in diverse condizioni ambientali. Nel corso delle sperimentazioni, studi in vitro hanno permesso di valutare la cinetica di azione di AMP PEP1 contro ceppi di riferimento di *Staphylococcus aureus* (tra cui uno resistente alla meticillina) e contro un ceppo moderato produttore di biofilm di *S. aureus* enterotossigeno isolato da matrice alimentare. Il peptide ha mostrato un'azione rapida e notevole. Ulteriori ricerche hanno mirato a valutare l'efficacia di AMP PEP1 anche contro batteri patogeni Gram-negativi. *Salmonella enterica* è stata scelta come rappresentativa dell'intero gruppo. Nello studio sono stati inclusi 44 ceppi appartenenti a tre diverse sottospecie e 35 diversi sierotipi, di cui è stato

determinato anche il profilo antimicrobico. La concentrazione inibitoria minima (MIC) di PEP1 è risultata compresa tra 8 e 64 µg/ml, con valori di MIC di 16 µg/ml e 32 µg/ml rispettivamente per il 54% e il 43% dei ceppi oggetto dei saggi. La concentrazione battericida minima (MBC) variava tra 16-128 µg/ml. Concentrazioni subinibitorie di PEP1 hanno ridotto la formazione di biofilm in alcuni ceppi inclusi in questo studio. Infine, lo studio si è focalizzato sulla funzionalizzazione del peptide e sulla valutazione dell'attività antimicrobica di nanobiocomplessi risultanti dalla coniugazione covalente di AMP PEP1 alla superficie di nanoparticelle ibride polimero-oro (AuNPs), preliminari all'applicazione del peptide come sanizzante di nuova generazione nel comparto dell'industria agro-alimentare; come sperimentalmente verificato, concentrazioni submicromolari di AMP PEP1 bioconiugato ad AuNPs, uccidono quasi il 100% di batteri patogeni Gram⁺ e Gram⁻, come *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.*, aprendo la strada a prodotti commerciali economicamente sostenibili.

***CAPITOLO 1* ABITUDINI ALIMENTARI E RISCHIO ZONOSI**

1.1 EVOLUZIONE DEI TREND DI CONSUMO ALIMENTARE

Nella società contemporanea appare sempre più stretto e vincolante il legame tra le abitudini alimentari dei consumatori e le esigenze dell’Industria in termini di innovazione tecnologica.

Gli importanti cambiamenti socio-demografici e, conseguentemente, degli stili di vita della popolazione hanno determinato un graduale, e talvolta radicale, mutamento della domanda di beni alimentari: l’aumento del numero dei *single* e delle famiglie mononucleari, insieme alla diminuzione del tempo disponibile da dedicare alla preparazione dei pasti, infatti, ha costretto l’industria ad adeguarsi alle nuove esigenze dei consumatori in fatto di praticità e velocità d’uso. Tale necessità si è tradotta in investimenti sostanziali in Ricerca e Sviluppo (Research and Development, R&D) e in tecnologie innovative per poter offrire prodotti con un alto valore di servizi, quali cibi e preparazioni gastronomiche pronte al consumo (ready to eat, RTE).

L’inclinazione a preferire tali tipologie di prodotto si è rafforzata nell’ambito del settore delle carni, uno dei principali mercati per giro d’affari: nel 2019 ha raggiunto solo nei canali Ipermercati e Supermercati un fatturato di 5,8 miliardi di euro, per un totale di 685 tonnellate vendute. Se si considera l’intero mercato della carne (carni rosse, carni bianche e carni rosa), il 2019 presenta un trend in leggero calo, con volumi venduti sostanzialmente stabili (-0,2%).

Dai dati IRI emerge inoltre il consolidamento della tendenza del consumatore, in atto già da alcuni anni, a preferire prodotti elaborati (es. cotolette, hamburger, salsicce, ecc.) a quelli freschi.

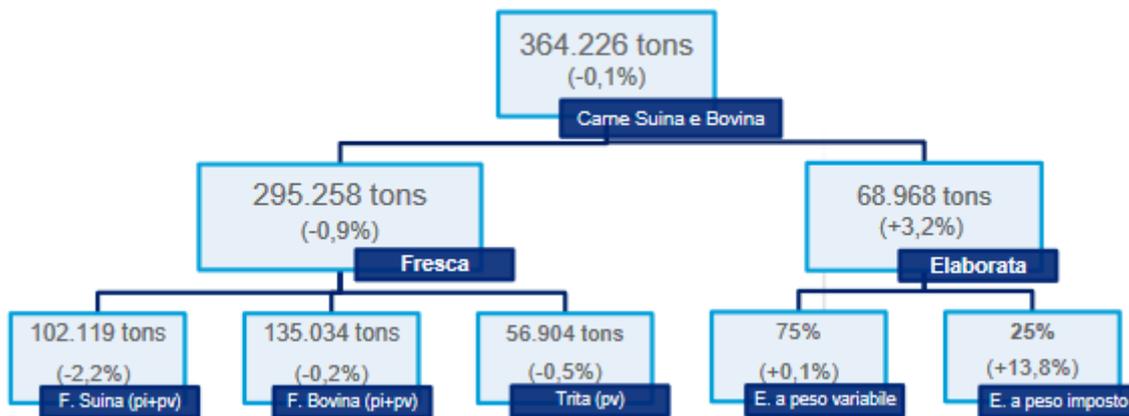


Fig. 1.1 Mercato della carne rossa e rosa, 2019.

Fonte: IRI InfoScan Census®, IRI Random Weight®

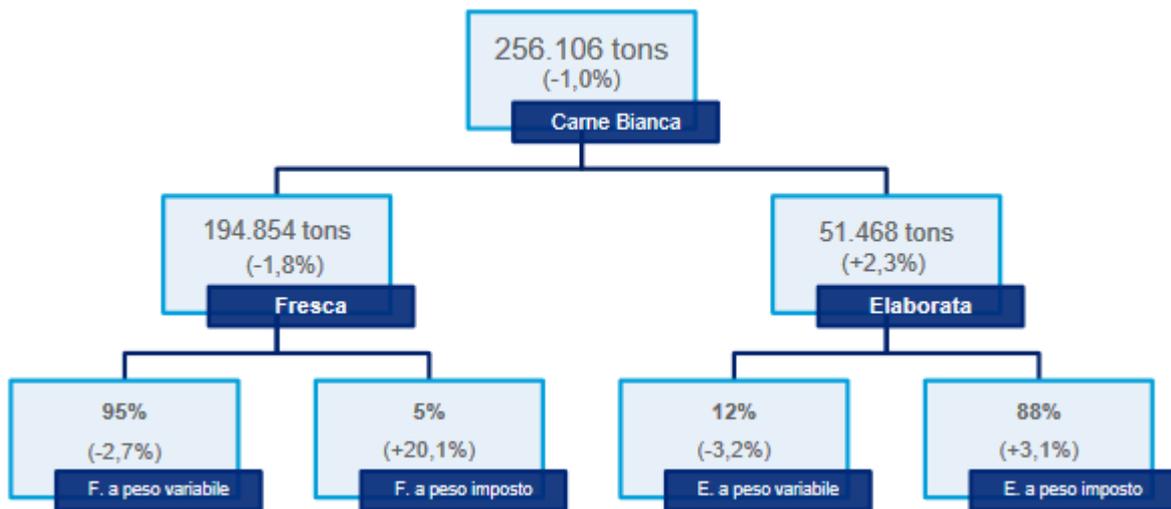


Fig. 1.2 Mercato della carne bianca, 2019.

Fonte: IRI InfoScan Census®, IRI Random Weight®

Parallelamente, però, il consumatore mostra anche sempre maggiore attenzione alla tutela della salute: le richieste di naturalità e freschezza, nonché di funzionalità e trasparenza in etichetta, implicano l'applicazione di nuovi processi produttivi capaci di garantire alimenti con caratteristiche peculiari, mantenendo prezzi competitivi senza mai perdere di vista la qualità igienico-sanitaria.

Il comparto agro-alimentare deve necessariamente mostrarsi flessibile per adeguarsi ai nuovi trend di mercato, attraverso un continuo aggiornamento delle tecnologie produttive in grado di assicurare una prolungata *shelf-life* del prodotto, pur nel rispetto della richiesta di alimenti a basso contenuto di additivi e conservanti.

In questo scenario emerge dell'importanza dell'igiene della produzione e della sanificazione come momenti di prevenzione del rischio microbiologico, cui prodotti altamente elaborati e pronti al consumo sono naturalmente esposti.

1.2 I DATI EPIDEMIOLOGICI

La presenza di microrganismi patogeni in un alimento è essenzialmente riconducibile a fenomeni di contaminazione. Tale condizione può realizzarsi in diversi momenti del ciclo produttivo, a carico delle materie prime e degli ingredienti, durante i processi di lavorazione e preparazione per contatto con superfici, utensili e attrezzature contaminate, nonché nel post produzione, durante il confezionamento, lo stoccaggio e la distribuzione

La sopravvivenza e la crescita di microrganismi patogeni in un alimento dipendono da fattori intrinseci alla matrice, quali le sue caratteristiche chimico-fisiche (pH, potenziale redox “rH”, acqua libera “aw”, ecc.) e la natura della flora batterica saprofita eventualmente presente, nonché da condizioni estrinseche, quali il tempo, la temperatura e l’ambiente di conservazione o le modalità di preparazione e somministrazione, specie se condotte con scarse cautele igieniche.

Secondo il Regolamento CE 178/2002 e il Regolamento CE 852/2004, tutte le imprese coinvolte in operazioni di preparazione, trasformazione, fabbricazione, confezionamento, deposito, trasporto e vendita degli alimenti, sono tenute ad adottare una procedura di autocontrollo nell’ambito della propria attività, allo scopo di garantire la sicurezza igienico-sanitaria degli alimenti.

Data l’ampia gamma di imprese alimentari considerate dal Reg. CE 852/2004, la Commissione Europea ha redatto delle Linee Guida generali, ispirate ai principi enunciati nel *Codex Alimentarius*, che forniscono indicazioni sull’applicazione delle prescrizioni in materia di HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point), che a sua volta presuppone già attive le buone pratiche igieniche (Good Hygienic Practices, GHP) nell’ambito delle più generali norme di buona prassi di produzione (Good Manufacturing Practices, GMP).

Per proteggere i consumatori, inoltre, l’UE ha adottato un approccio integrato alla sicurezza alimentare dall’azienda agricola al consumatore finale, che consiste in misure di valutazione, gestione e comunicazione dei rischi.

Nel 2019 sono tornate a crescere le notifiche trasmesse attraverso il Sistema di allerta rapido per alimenti e mangimi (RASFF), lo strumento utilizzato dagli Stati membri per scambiarsi allerte e informazioni sugli alimenti che potrebbero rappresentare un rischio per la salute dei cittadini dell’Unione.

Stando al rapporto annuale pubblicato dalla Commissione Europea, la prima causa di segnalazione attraverso il RASFF continua a essere la presenza di microrganismi patogeni: nel 2019 sono state inviate ben 974 notifiche per contaminazioni microbiche, di cui 575 riguardanti prodotti alimentari provenienti da Stati membri e 399 da Paesi terzi.

Nello stesso anno, l'Italia ha trasmesso attraverso il RASFF un totale di 373 notifiche, pari al 9,3% del totale, e risulta il quarto Paese membro per numero di segnalazioni inviate dietro Germania, Regno Unito e Paesi Bassi. La carne e le preparazioni di carne (diversa dal pollame) e la carne di pollo e le preparazioni di carne di pollo, in particolare, sono stato oggetto rispettivamente di 23 e 22 notifiche (RASFF 2019).

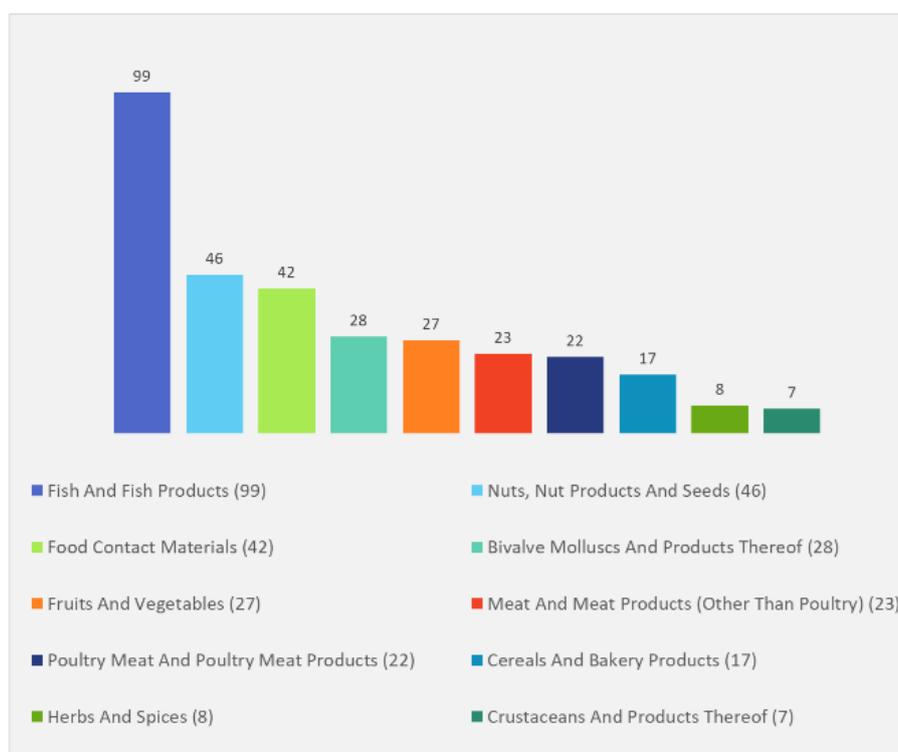


Fig. 1.3 Principali prodotti alimentari/mangimi/MOCA notificati dall'Italia.

Fonte Relazione Annuale RASFF 2019

Tra i contaminanti microbiologici, un elevato numero di notifiche è associato a positività a *Salmonella spp.*; numerose sono risultate essere anche le segnalazioni per *Listeria monocytogenes*. Tra gli altri, è doveroso segnalare *Staphylococcus aureus*, patogeno responsabile di una delle tossinfezioni alimentari più diffuse al mondo e oggetto di attenzione crescente per la resistenza agli antibiotici mostrata da alcuni ceppi appartenenti alla specie (methicillin-resistance *S. aureus*, MRSA).

1.2.1 *Salmonella spp.*

I batteri del genere *Salmonella* sono bacilli Gram-negativi, asporigeni e anaerobi facoltativi, mobili per la presenza di flagelli peritrichi (Nataro et al., 2011). Le pareti cellulari di *Salmonella spp.* contengono

lipopolisaccaridi che vengono liberati dopo la lisi e si comportano come un'endotossina termolabile con azione pirogenica, responsabile delle tossinfezioni. Condizioni ottimali di crescita sono rappresentate da una temperatura compresa tra i 35°C e i 43°C, un pH tra 6.5 e 7.5, una aw pari a 0,84 e una concentrazione salina fino al 4%. (Arvis et al., 2016).

Salmonella è causa di numerosi focolai di tossinfezione alimentare nell'eurozona. Nel 2018 sono stati segnalati 91.857 casi confermati di salmonellosi nell'uomo e ben 1.580 focolai derivanti dal consumo di alimenti contaminati, pari al 30,7% del totale.

I tre sierotipi più comunemente segnalati (*S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, compresa la variante *monofasica*) sono responsabili di quasi l'80% dei casi di Salmonellosi umana nell'UE. Come negli anni precedenti, i focolai di Salmonellosi sono imputabili principalmente a *S. Enteritidis* e relazionabili per quasi il 50% del totale al consumo di uova e prodotti derivati, seguiti dai prodotti di pasticceria e dalle preparazioni miste. Tale evidenza può essere spiegata in ragione dell'ampio utilizzo delle uova come ingredienti nella preparazione di specialità alimentari e del rischio di inadeguata conservazione a temperature non idonee, più elevato che per altre categorie di prodotto (EFSA e ECDC, 2019).

Tra i prodotti alimentari, tuttavia, il numero più elevato di campioni positivi al riscontro analitico per la ricerca di Salmonella è stato registrato in carne di pollame, carni macinate e preparazioni di carni destinate ad essere cotte prima del consumo (EFSA e ECDC, 2019).

Tab. 1.1 Prevalenza di *Salmonella* spp. nelle principali categorie alimentari (2014-2018).

	2018	2017	2016	2015	2014	Data source
Food						
Meat and meat products						
Number of sampled units	417,886	364,979	247,749	183,733	507,116	EFSA
Number of reporting countries	28	28	26	27	24	EFSA
Milk and milk products						
Number of sampled units	44,078	30,796	24,337	29,034	70,298	EFSA
Number of reporting countries	24	24	24	22	23	EFSA
Fish and fishery products						
Number of sampled units	17,123	13,507	12,287	11,373	17,053	EFSA
Number of reporting countries	22	22	21	22	20	EFSA
Eggs and egg products						
Number of sampled units	10,611	15,435	10,933	9,650	23,303	EFSA
Number of reporting countries	21	23	20	19	18	EFSA
Fruits and vegetables (and juices)						
Number of sampled units	10,888	7,579	7,515	6,797	10,372	EFSA
Number of reporting countries	22	25	20	22	22	EFSA

Fonte EFSA, 2019.

Nel dettaglio, le percentuali più elevate di positività a *Salmonella spp.* sono state rilevate nelle carni fresche di pollo (7,15%) e di tacchino (7,07%), e prevalentemente in fase di monitoraggio presso il macello. Per i prodotti elaborati e *ready to eat*, invece, le positività sono state riportate principalmente negli stabilimenti di trasformazione, a dimostrazione che le GMP e le GHP sono determinanti nella definizione del profilo microbiologico di tali categorie di prodotto.

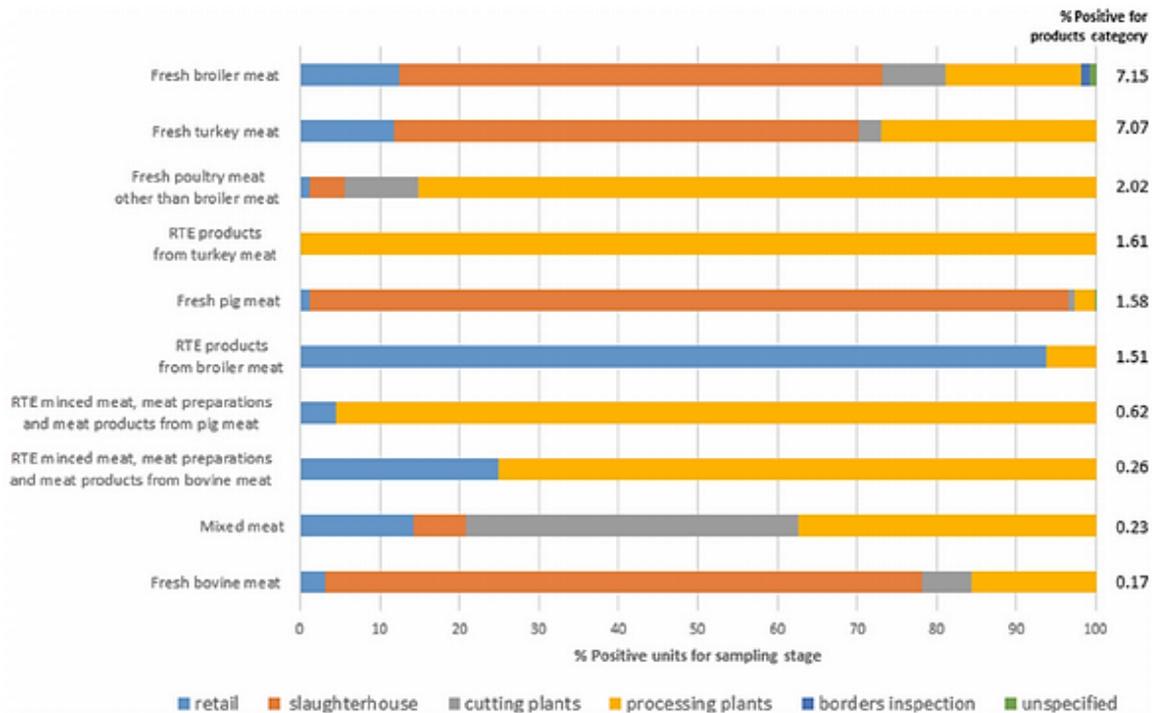


Fig. 1.4 Monitoraggio di *Salmonella spp.* in carne e prodotti derivati, 2018.

Fonte EFSA, 2019.

1.2.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes è un batterio Gram-positivo di forma bastoncellare e di piccole dimensioni (1-5 µm di lunghezza), acapsulato, asporigeno e mobile per la presenza di flagelli. Sopravvive e cresce in diverse condizioni ambientali, con ampi intervalli di pH, a concentrazioni di sale anche superiori al 10% e a temperature comprese tra 2°C e 45°C (optimum compreso tra 30°C e 37°C) (Wang et al., 2013; De Felip, 2001).

Listeria monocytogenes è agente causale di una grave malattia di origine alimentare sotto la sorveglianza dell'UE, a causa del numero dei ricoveri ospedalieri, dell'elevata morbilità e dell'elevato tasso di mortalità (15,6%) che la caratterizzano. Dall'avvio della sorveglianza nel 2008, la listeriosi

umana ha mostrato una tendenza statisticamente significativa al rialzo. Nel 2018, sono stati segnalati 14 focolai di listeriosi di origine alimentare, che hanno causato 158 casi di malattia conclamata nell'uomo.

Gli alimenti RTE presentano un rischio più elevato di listeriosi (Henriques et al., 2017), in quanto destinati ad essere consumati senza ulteriore applicazione di calore. La conservazione a temperatura controllata, l'acidificazione, la salagione o l'affumicatura, inoltre, non sono sufficienti per il controllo di *Listeria* in ragione della sua alta resistenza alle temperature di refrigerazione e congelamento, oltre che alla variazione di pH, aw e salinità (Raheem, 2016).

Nel 2018, come negli anni precedenti, le categorie alimentari RTE più campionate per la rilevazione e/o l'enumerazione di *L. monocytogenes* sono state la carne e prodotti carnei RTE (37,5% dal totale dei RTE campionati), seguiti da latte e prodotti lattiero-caseari RTE (36,6%). La presenza notificata di *L. monocytogenes* ha oscillato a seconda della categoria alimentare RTE dallo 0,09% per i formaggi a pasta dura ottenuti da latte pastorizzato fino al 3,1% per la carne bovina RTE (EFSA e ECDC, 2019) ed è un importante indicatore del livello di rischio nell'UE.

Tab. 1.2 Principali categorie di alimenti RTE campionate nell'Eurozona (2014-2018).

	2018	2017	2016	2015	2014	Data source
RTE food categories						
RTE milk and milk products	N = 59,313; 23 MS	N = 56,428; 25 MS	N = 34,850; 26 MS	N = 45,996; 24 MS	N = 68,497; 24 MS	EFSA
RTE meat and meat products	N = 57,861; 22 MS	N = 45,219; 24 MS	N = 25,195; 210 MS	N = 25,396; 22 MS	N = 18,720; 21 MS	EFSA
RTE fish and fishery products	N = 14,081; 22 MS	N = 12,604; 24 MS	N = 6,601; 23 MS	N = 7,986; 25 MS	N = 29,341; 21 MS	EFSA
Other RTE food products	N = 25,179; 22 MS	N = 23,915; 23 MS	N = 21,085; 22 MS	N = 25,544; 23 MS	N = 32,126; 23 MS	EFSA
RTE foods intended for infants and for special medical purposes	N = 1,663; 18 MS	N = 1,462; 20 MS	N = 1,274; 16 MS	N = 1,754; 12 MS	N = 1,233; 10 MS	EFSA

Fonte EFSA, 2019.

Il monitoraggio di *L. monocytogenes* viene effettuato lungo la filiera agro-alimentare, dall'allevamento alla produzione (macelli, laboratori di sezionamento), fino alla fase di post-trasformazione (vendita al dettaglio, ristorazione), in ragione del fatto che ciascuna delle fasi può rappresentare un momento di contaminazione (Kačániová et al., 2015).

Il rischio *Listeria* per la salute pubblica rappresentato dai RTE dipende dall'efficacia del suo controllo, che comprende l'attuazione di buone pratiche agricole (*Good agricultural practice*, GAP), del programma GMP e del piano HACCP (sanificazione) durante la lavorazione e la vendita.

1.2.3 *Staphylococcus aureus*

Gli stafilococchi sono batteri Gram-positivi di forma rotondeggiante e di piccole dimensioni, asporigeni, immobili, aerobi o anaerobi facoltativi. *Staphylococcus aureus*, capostipite del gruppo, è tollerante a elevate concentrazioni di sale ($\text{NaCl} > 10\%$), cresce in un intervallo di pH tra 4.5 e 9.3, pur prediligendo la neutralità (pH tra 7.0 e 7.5), in un ampio range di temperature, compreso tra 7°C e 47°C, (optimum 37°C), e a condizioni minime di aw di 0,83 (optimum > 0,99). (ICMSF, 1996).

L'intossicazione alimentare da stafilococco è una delle tossinfezioni più comuni al mondo (McCormick et al., 2001; Hennekinne et al., 2012), spesso relazionabile al consumo di prodotti pronti al consumo (Diep et al., 2006). *S. aureus*, infatti, non compete bene con il microbiota indigeno degli alimenti crudi, per cui la contaminazione è principalmente associata a una manipolazione impropria degli alimenti cotti o trasformati, seguita dalla conservazione in condizioni che permettono la crescita del patogeno e la produzione dell'enterotossina.

Nel 2018, il monitoraggio relativo a *Staphylococcus spp.* ha riportato una prevalenza dell'8,4% su un totale di 15.598 unità campionarie analizzate; la positività è stata riscontrata soprattutto in latte e prodotti lattiero-caseari, carni rosse e bianche, preparazioni gastronomiche, piatti pronti e insalate RTE. Non è raro ormai l'isolamento di ceppi di *S. aureus* dotati di resistenza ai farmaci (multidrug-resistant, MDR) da campioni umani o alimentari associati a focolai d'intossicazione alimentare (Sauer et al., 2008; Huang et al., 2009; Gharsa et al., 2012; Papadopoulos et al., 2018). Negli ultimi decenni, infatti, l'uso diffuso e talvolta indiscriminato di antibiotici ha facilitato la comparsa di agenti patogeni resistenti, come *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA) (Valsangiacomo et al., 2000; Grema et al., 2015). La prevalenza apparentemente crescente di MRSA negli animali e negli alimenti derivati desta preoccupazione, in ragione della possibile evoluzione di focolai di tossinfezione in vere e proprie epidemie (Grøntvedt et al., 2016).

***CAPITOLO 2* L'AZIENDA PARTNER DEL DOTTORATO INDUSTRIALE**

2.1 GRANCARNI SRL

GRANCARNI S.r.l. è una realtà produttiva che insiste sul territorio campano, operando nel settore “Carni e pollame” freschi, con sede legale in Casapulla, provincia di Caserta. L’azienda fa parte di una holding che ha una storia di oltre 30 anni, con una *vision* dinamica e orientata in diversi settori, Food e Non Food.

L’azienda è nata dall’idea del Socio fondatore, che nel 2003 predispose un piccolo laboratorio produttivo per la realizzazione di preparazioni di carne da distribuire nei reparti macelleria presenti nei punti vendita (pdv) del gruppo, con l’intento di centralizzare le lavorazioni e standardizzare i processi al fine di ottenere un prodotto di qualità, microbiologicamente ineccepibile. Il successo di questa intuizione industriale è la ragione della crescita esponenziale del fatturato e dell’aumento del numero dei pdv, che ha reso necessaria la conseguente evoluzione del laboratorio di produzione iniziale nell’attuale stabilimento produttivo.

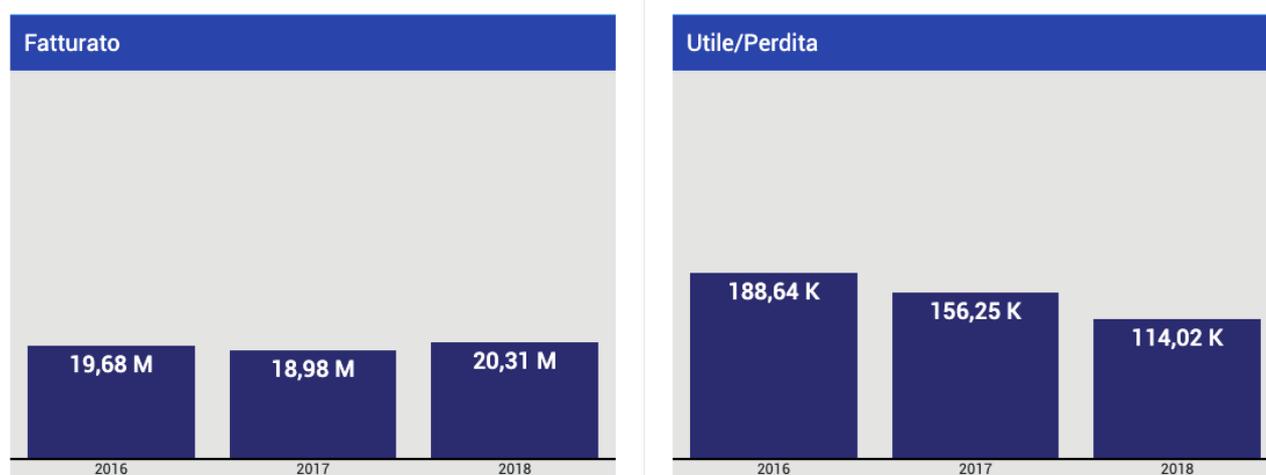


Fig. 2.1 Trend fatturato e utile aziendale. Dati pubblici.

Fonte www.reportaziende.it

Grancarni S.r.l. rappresenta un soggetto imprenditoriale innovativo nel comparto carni, che si contraddistingue per la volontà di affiancare al tradizionale rapporto di fornitura al trade un modello di servizio completo, personalizzabile, finalizzato a semplificare il carico operativo sui punti vendita della grande distribuzione organizzata (GDO) e a snellire i costi di gestione dei prodotti freschi.

Il sistema produttivo Grancarni si basa su una filiera corta, che limita il ricorso a trattamenti conservativi, e investe in tracciabilità e innovazione tecnologia con l’obiettivo di garantire prodotti al consumo di elevata freschezza in totale sicurezza, nel pieno rispetto delle normative cogenti.

L'azienda, d'altro canto, impiega costantemente risorse in Ricerca e Sviluppo per implementare e rinnovare periodicamente l'assortimento dei prodotti proposti e mantenere alto il livello di attrattività e competitività sul mercato.

Ad oggi, il gruppo opera in due stabilimenti differenti, il primo sito in Pontelatone (CE), riconosciuto ai sensi del Reg. CE 853/2004 per la lavorazione di carni di ungulati domestici, e il secondo con sede in Volla (NA), riconosciuto invece per la lavorazione di carni di avicunicoli.

L'organico aziendale è composto da figure a vario titolo competenti e specializzate nel settore, che partecipano fattivamente allo svolgimento dell'attività dell'azienda, dalla gestione amministrativa a quella puramente operativa.

L'attività svolta da Grancarni S.r.l. consiste in stoccaggio, sezionamento, lavorazione/preparazione e commercio all'ingrosso di carni delle specie bovina, suina, ovina e caprina, nonché delle carni bianche di avicunicoli. I prodotti a marchio Grancarni sono principalmente e in massima parte destinati alla GDO, o altresì venduti ad aziende che effettuano a loro volta commercializzazione diretta o per terzi al consumatore finale.

Qualunque sia la destinazione finale, alla piattaforma vengono spedite carni fresche in osso, carni porzionate e confezionate in atmosfera modificata, carni macinate, preparazioni di carne (hamburger, spiedini, prodotti panati, ecc.) e preparazioni gastronomiche.

In ottemperanza al Reg. CE 1169/2011, inoltre, la presenza di allergeni e la natura e composizione dei prodotti commercializzati risulta chiaramente e immediatamente comprensibile al consumatore anche in funzione della grafica utilizzata per il packaging primario.

2.1.1 I locali – Stabilimento di Pontelatone (prov. CE)

Lo stabilimento, pur di non recente costruzione, ma progettato nel rispetto dei requisiti strutturali e igienico-sanitari previsti dal Reg. 852/2004 CE e Reg. 853/2004 CE, è stato nel tempo adattato e modificato per rispondere ad esigenze produttive in costante evoluzione.

L'impianto industriale sorge in un'area distante da fonti di contaminazione tali da rappresentare un potenziale pericolo per la salute dei lavoratori e per i prodotti alimentari, ed è strategicamente posizionato nei pressi di uno svincolo autostradale, in una località che offre ottimi collegamenti logistici.

L'approvvigionamento idrico di acqua potabile e la fornitura di elettricità sono garantiti da fornitori certificati. I reflui di lavorazione e le acque nere vengono convogliate in un depuratore esterno dimensionato alla struttura e alle attività svolte.

Le pareti interne, che suddividono l'impianto nelle diverse aree operative dedicate, sono costituite da pannelli coibentati formati da un sandwich di due lamiere preverniciate a fuoco lavabili e sanificabili, con interposto poliuretano schiumato che consente un'elevata capacità termica.

I pavimenti sono rivestiti da materiale facilmente lavabile e disinfettabile, resistente, impermeabile all'acqua, antisdrucchiolo e privo di soluzioni di continuo, ed è dotato di griglie e pozzetti di raccolta delle acque sifonati e in acciaio inox. I soffitti e le strutture sono costruiti in modo da evitare accumuli di sporczia o di condensa, formazione di muffa o spandimenti di particelle.

Le porte di carico e scarico, costruite con materiale liscio e non assorbente, sono dotate di sistemi di apertura e chiusura automatica; le porte interne e quelle verso l'esterno sono adeguatamente dimensionate e protette per prevenire l'ingresso di infestanti.

Tutte le attrezzature e le superfici di lavoro sono costruite in materiale idoneo al contatto con gli alimenti e facilmente lavabili e sanificabili.

Le materie prime, i semilavorati e i prodotti finiti non subiscono alcun incrocio e le diverse lavorazioni possono svolgersi in ambienti dedicati, secondo un layout che garantisce l'unidirezionalità delle movimentazioni.

Gli impianti di refrigerazione in uso, sia a temperatura negativa che a temperatura positiva, risultano idonei per potenza e dimensionamento e installati nella sala motori, dove trovano posto anche le caldaie per il riscaldamento dell'acqua per le operazioni di pulizia e sanificazione. I locali di produzione sono adeguatamente refrigerati attraverso sistemi di evaporazione che assicurano una temperatura controllata inferiore ai 12°C. Tutte le aree e le celle di stoccaggio risultano munite di idonei indicatori di temperatura (display luminosi) collegati a un software per il controllo costante e in remoto delle temperature; un sistema di alert informatizzato consente di intervenire prontamente qualora si registri l'interruzione della catena del freddo.

I locali di lavoro sono dotati di un sistema di trattamento dell'aria (UTA) e di ventilazione, che permettono la filtrazione e il rinnovo dell'aria; ogni ambiente, inoltre, risulta adeguatamente illuminato e di facile ispezione.

Nei locali di lavoro sono presenti dispositivi per la sanificazione delle mani e delle attrezzature, in numero congruo alle attività previste e al personale impiegato.

Presso ogni postazione lavorativa sono presenti sterilizzatori elettrici ad acqua per i coltelli dotati di termometro per il controllo periodico delle temperature di esercizio.

I servizi igienici e lo spogliatoio sono adeguatamente dimensionati per il personale in servizio, facilmente accessibili e dotati di armadietti, docce, erogatori di sapone liquido, acqua calda e fredda, asciugamani elettrici e bidoni per la raccolta di eventuali piccoli rifiuti.

In prossimità dei servizi sono stati apposti cartelli che richiamano la necessità del lavaggio delle mani dopo l'uso dei servizi igienici e prima del ritorno al lavoro.

2.1.2 Il ciclo operativo

Grancarni S.r.l. seleziona accuratamente le materie prime e si rivolge solo a fornitori qualificati, riconosciuti e/o autorizzati; la programmazione degli ordini in base alle previsioni di lavoro agevola il controllo sulle merci in ingresso e la gestione delle giacenze di magazzino, perché si possa disporre sempre di prodotti in condizioni di freschezza.

Il controllo delle merci allo scarico è un momento cruciale del ciclo operativo industriale, poiché permette di valutare tanto la corrispondenza all'ordine, quanto l'idoneità dei prodotti in ingresso nello

stabilimento in base agli standard qualitativi fissati dall'azienda. A questo scopo, parallelamente al controllo della documentazione di accompagnamento ai prodotti (documenti commerciali e di trasporto, tracciabilità, ecc.), viene verificata la temperatura del vano di carico dell'automezzo con termometro a infrarossi e la temperatura al cuore della carne con termometro a sonda. La merce è considerata idonea se, al momento dello scarico, la temperatura al cuore non supera i +7°C per le carcasse bovine, suine, ovi-caprine e i + 3°C per le frattaglie.

Contestuale al rilevamento della temperatura è anche il controllo dello stato igienico dell'automezzo, che mira a valutare la presenza di condizioni indice di scarsa pulizia (macchie persistenti, insudiciamenti, residui di alimenti deperibili) e/o di promiscuità di trasporto con prodotti non compatibili.

Le materie prime non soggette a disposizioni particolari di temperatura (additivi, aromi, ecc.) sono scaricate in un'area dedicata; in questo caso, il controllo è diretto a valutare l'integrità delle confezioni, la conformità dell'etichettatura, la data di scadenza e la corrispondenza dei lotti per la corretta gestione della tracciabilità.

Superati i controlli allo scarico, le materie prime in ingresso vengono registrate sul software gestionale SEUROP, studiato e progettato per rispondere alle esigenze delle industrie che operano nel settore delle carni. Il supporto informatico garantisce la tracciabilità, e conseguentemente a ritroso la rintracciabilità, delle materie prime e il controllo della loro movimentazione (dalle lavorazioni interne allo stabilimento alla consegna), nonché la corretta gestione delle giacenze.

Adeguatamente identificati mediante apposizione/punzonatura di etichette, i prodotti in ingresso vengono divisi per categoria merceologica e stoccati nelle rispettive celle o aree di conservazione, per essere poi successivamente avviati alle operazioni di sezionamento, lavorazione e confezionamento.

Tutte le operazioni seguono il procedimento dell'avanzamento orizzontale e i rischi relativi alla contaminazione crociata sono contenuti con la separazione delle lavorazioni nel tempo e/o nello spazio, grazie alla preventiva suddivisione degli ambienti di lavoro in aree produttive dedicate:

- Area di sezionamento e disosso bovino/ovino
- Area di sezionamento e disosso suino
- Area di produzione di preparati
- Area di produzione di prodotti panati
- Area di confezionamento.

Un'attenzione particolare è dedicata alle linee dei prodotti elaborati e di gastronomia, in ragione dell'elevata manualità richiesta per la produzione. Tali preparazioni prevedono l'utilizzo di materie prime che hanno già subito precedenti manipolazioni (carni macinate, tagli di carne). Gli additivi, le

spezie e gli ingredienti di farcitura vengono preparati e miscelati in locali dedicati e quindi trasferiti nell'area di produzione all'interno di contenitori chiusi, con coperchio, opportunamente etichettati, per contenere il rischio di eventuali cross contaminazioni. Le proporzioni sono indicate da ricette standard inserite nel sistema gestionale, che consente di verificare in tempo reale lo scarico dal magazzino e i bilanci di massa dei lotti di produzione.

Tutti i prodotti finiti vengono infine trasferiti in un'area adibita al confezionamento e all'etichettatura e quindi stoccati in una cella frigo, in attesa del picking e della spedizione.

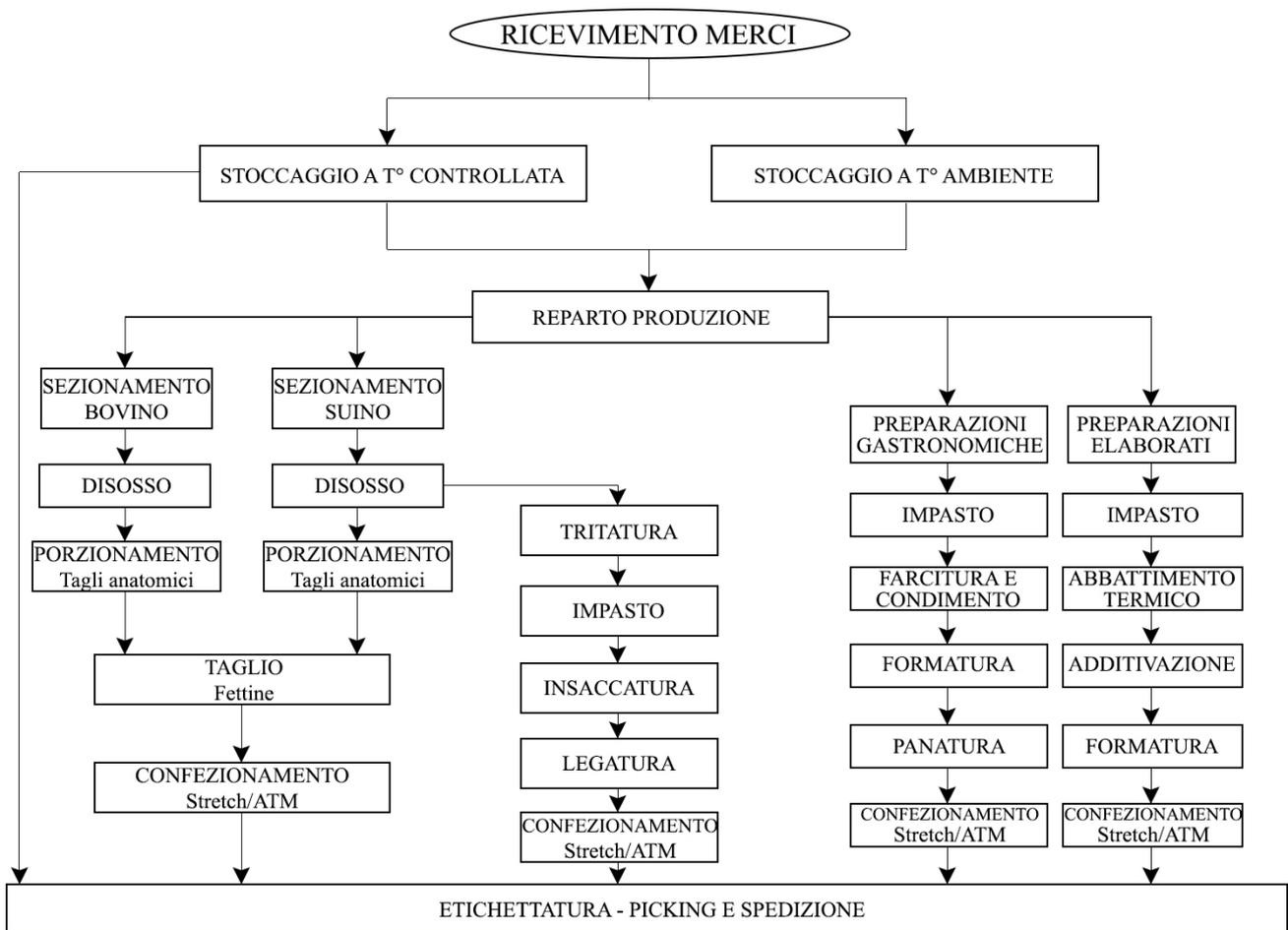


Fig. 2.3 Diagramma di flusso del ciclo operativo aziendale

2.2 ATTIVITÀ SVOLTA DURANTE IL PERIODO AZIENDALE

Le attività svolte durante il periodo di permanenza in Impresa si inseriscono nel novero di quelle già sotto la responsabilità del Controllo Qualità e si inquadrano nel più ampio campo d'azione del Sistema di Gestione della Qualità stessa, che le aziende strutturate come Grancarni S.r.l. istituiscono e mantengono per conseguire l'ineccepibile sicurezza dei prodotti finiti.

Nell'ambito del processo produttivo, il controllo della qualità si esplica in mansioni e adempimenti obbligatori previsti dalle normative cogenti, nonché dai requisiti specifici indicati dagli standard di certificazione volontaria. Tali attività, in particolare, comprendono lo studio dei layout degli ambienti e dei flussi, la valutazione delle procedure e delle istruzioni operative definite nel Manuale di Autocontrollo aziendale, e il monitoraggio periodico e puntuale dei punti critici di ciascun processo così come individuati dal Piano HACCP.

La conoscenza delle tecnologie produttive e l'indipendenza operativa acquisita nel corso dell'esperienza sul campo hanno offerto all'Azienda, già in fase di espansione sul mercato della GDO, la possibilità di allargare le proprie prospettive con la creazione di un team di R&D per la progettazione di nuove referenze in linea con l'evoluzione delle richieste del consumatore riguardo alimenti *ready to cook* (RTC) e *ready to eat* (RTE).

Il team, composto da figure a vario titolo competenti, ha potuto contare sull'apporto di conoscenze tecniche e sull'approccio scientifico-universitario nella delicata fase di creazione di nuove referenze e di sviluppo e implementazione delle procedure operative per la loro realizzazione.

Tra le attività di supporto, in tal senso, si annoverano la qualifica dei fornitori di materie prime, la verifica dell'idoneità all'uso di ingredienti e additivi secondo i dettami normativi cogenti, la standardizzazione delle fasi di produzione, lo studio delle modalità di confezionamento, la determinazione della durabilità del prodotto sottoposto a *stress test* e la validazione della sicurezza del prodotto finito attraverso analisi del profilo microbiologico (Reg. CE 2073/05).

In sede di valutazione dei rischi connessi alla produzione sperimentale di prodotti RTE, il team per la sicurezza alimentare ha implementato l'insieme delle procedure preesistenti, dedicando particolare attenzione alla formazione del personale impiegato, all'innovazione delle tecnologie produttive e conservative, oltre che ai protocolli di pulizia e sanificazione.

Il contributo della qualità è imprescindibile per assicurare l'affidabilità, la garanzia e la sicurezza che il consumatore ricerca oggi nei prodotti RTE. La qualità dimostra in questo senso tutta la sua valenza economica: pur richiedendo onerosi investimenti iniziali, infatti, sa assicurare nel tempo il successo dell'Azienda in termini di fatturato grazie al miglioramento dell'efficienza dei protocolli di sanificazione, delle performance produttive e della visibilità del marchio, con conseguente riduzione

degli scarti, dei reclami e delle contestazioni. Il confronto diretto e giornaliero con la realtà imprenditoriale è all'origine dell'acquisizione di competenze tecniche e operative essenziali per la valutazione delle potenzialità applicative di strategie innovative di sanificazione nell'industria alimentare, oggetto della parte sperimentale del dottorato.

2.3 PRINCIPI DI SANIFICAZIONE NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE

La normativa europea in materia di sicurezza alimentare è estremamente rigorosa nella garanzia della salute del consumatore rispetto alle malattie a trasmissione alimentare.

L'articolo 4 del Regolamento CE n. 853/2004 sull'igiene dei prodotti alimentari impone agli operatori del settore alimentare (OSA) di rispettare i requisiti generali in materia d'igiene di cui agli allegati I e II del Regolamento, integrati da requisiti specifici in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, previsti dal Regolamento CE n. 853/2004. In un contesto internazionale di standard qualitativi, tali requisiti costituiscono i cosiddetti programmi di prerequisiti.

Per programmi di prerequisiti (prerequisite program, PRP) si intendono tutte le prassi e condizioni di prevenzione necessarie prima e durante l'attuazione del sistema HACCP, che sono quindi essenziali per la sicurezza alimentare. I PRP dipendono dal segmento della filiera alimentare in cui opera l'impresa e dal tipo di settore. Esempi pratici sono selezione corretta delle materie prime, monitoraggio dell'aria e dell'acqua, manutenzione delle apparecchiature e tarature e le operazioni di sanificazione, tutte procedure pre-operative che, se eseguite correttamente, servono a garantire il successo della produzione (Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 30.7.2016).

Al fine di garantire la sicurezza degli alimenti in fase di produzione è essenziale che nell'industria agroalimentare sia assicurata la piena e costante adesione alle pratiche igieniche e alle procedure di sanificazione, come richiesto dalla normativa e quindi definito nei manuali di buona prassi igienica di settore e nei piani HACCP aziendali.

La sanificazione comprende operazioni di pulizia e disinfezione che vanno intese come un insieme di attività interconnesse tra di loro.

Per definizione, la *sanificazione* è un “complesso di procedimenti e operazioni atti a rendere sani determinati ambienti mediante l'attività di pulizia e/o di disinfezione e/o di disinfestazione ovvero mediante il controllo e il miglioramento delle condizioni del microclima per quanto riguarda la temperatura, l'umidità e la ventilazione ovvero per quanto riguarda l'illuminazione e il rumore” (DM 7 luglio 1997, n. 274).

La sanificazione prevede tutti quei trattamenti di natura fisica e chimica che sono effettuati affinché una superficie risulti pulita fisicamente, ossia priva di sporco visibile, chimicamente, cioè priva di residui di sostanze utilizzate nel trattamento, e microbiologicamente, cioè il numero e il tipo di microrganismi inizialmente presenti siano ridotti a un livello accettabile. È utile precisare che non sono presenti limiti normativi in merito alla contaminazione microbiologica delle superfici e che il legislatore ha previsto unicamente che “gli operatori del settore alimentare che producono alimenti pronti, i quali possono sviluppare *Listeria monocytogenes* e presentare pertanto un rischio per la salute

pubblica, procedono nell'ambito del loro piano di campionamento al prelievo di campioni dalle aree di lavorazione e dalle attrezzature per la ricerca di *Listeria monocytogenes*". (art. 5 paragrafo 2 del Reg. CE 2073/2005).

La letteratura scientifica propone, tuttavia, standard di riferimento per verificare la corretta sanitizzazione delle superfici. Tali limiti generalmente non superano le 50 UFC/cm² per la carica batterica mesofila aerobica e 1 UFC/cm² per gli altri indicatori (streptococchi fecali) (Nortje et al., 1990; Orefice, 1984; Patterson, 1971, Solberg 1990; Sveum, 1992), su superfici post sanificazione. Viceversa, i valori limite della carica microbica oltre i quali si può avere un peggioramento della qualità dell'alimento e una sua maggiore deteriorabilità hanno ordini di grandezza pari a 10⁴- 10⁵ UFC/cm² (Orefice et al., 1988).

2.3.1 Il piano di sanificazione

Il successo del piano di sanificazione dipende da un'attenta valutazione del rischio specifico, che deve tener conto di variabili dipendenti dal segmento industriale in cui si opera. Il tipo di sporco, le caratteristiche e la temperatura dell'acqua, i prodotti chimici impiegati, la durata del lavaggio, la turbolenza delle soluzioni, i materiali costitutivi di attrezzature e impianti sono tutti fattori che condizionano l'efficacia e l'attuabilità delle procedure di pulizia e disinfezione, che, proprio per questo, non sono universalmente applicabili in tutto il comparto alimentare.

Una volta pianificato, il programma di sanificazione deve essere rigorosamente attuato ed efficacemente monitorato. La corretta applicazione delle procedure di pulizia e disinfezione non può prescindere dalla formazione del personale addetto alla sanificazione in fatto di proprietà e modalità d'uso dei composti detergenti e disinfettanti, nonché di funzionamento e manutenzione delle attrezzature in forza all'azienda.

Il piano di sanificazione consta di fasi in successione.

La *detersione* consiste nella rimozione e nell'allontanamento dello sporco e dei microrganismi in esso presenti, a cui consegue una riduzione della carica microbica contaminante. Il risultato dell'azione di detersione dipende da alcuni fattori, quali azione meccanica (es. sfregamento), azione chimica (detergente), temperatura e durata dell'intervento. La scelta del detergente, oltre che funzionale al tipo di sporco (organico o inorganico) e dipendente dalle attrezzature per la sanificazione in uso e dalle superfici da trattare, deve tenere in considerazione le caratteristiche intrinseche del prodotto, quali il potere emulsionante e disperdente e la capacità di operare con acque di diversa durezza.

La *disinfezione* riguarda il “complesso di procedimenti e operazioni atti ad abbattere la carica microbica di un ambiente, superficie o strumento”. I fattori che possono influenzare il risultato finale dell’operazione sono l’efficacia dell’azione di detersione, la completezza dell’azione di risciacquo, la natura e la concentrazione del disinfettante, nonché il tempo di contatto e il suo spettro d’azione.

Il risciacquo intermedio alle fasi consente di eliminare eventuali residui di sporco e di detergente, preparando al meglio le superfici per la disinfezione, mentre il risciacquo finale consente l’allontanamento di eventuali residui di soluzione disinfettante, evitando la possibilità di contatto diretto fra il prodotto chimico e quello alimentare. L’asciugatura con aria compressa e/o carta assorbente monouso, infine, eliminando l’umidità residua dalle superfici, riduce il rischio relativo alla proliferazione di microrganismi eventualmente sopravvissuti al trattamento (Butts, 2003).

Tab. 2.1 Esempio di procedura di sanificazione.

Fase	Prodotti	Concentrazione	T°	Tempo	Note
Frequenza giornaliera					
Preparazione					Coprire le parti delicate e quelle elettriche
Rimozione dallo sporco grossolano					Staccare i residui grossolani di lavorazione con l'ausilio di spazzole o raschietti
Prerisciacquo	Acqua potabile		20-60°C		Risciacquare tutte le superfici. Sulle superfici verticali indirizzare il getto d'acqua dall'alto verso il basso
Detersione alcalina	Detergente schiumogeno	2,0-5,0%	20-60°C	15 min	Applicare il detergente con il sistema a media pressione. Per superfici verticali procedere dall'alto verso il basso. Dopo l'applicazione lasciare agire per 10-15 minuti
Risciacquo intermedio	Acqua potabile		20-60°C		Rimuovere sporco e detergente risciacquando tutte le superfici
Sanitizzazione	Sanitizzante a base di acido peracetico	1,0-3,0%	20-60°C	15 min	Applicare con il sistema a media pressione. Per superfici verticali procedere dall'alto verso il basso. Lasciare agire per 10-15 minuti
Risciacquo finale	Acqua potabile		20-60°C		Rimuovere sporco e detergente risciacquando tutte le superfici
Controllo del lavaggio					Controllare visivamente tutti i punti e le aree critiche trattate. Ripetere la procedura se necessario
Frequenza	Secondo necessità, in sostituzione della detersione alcalina				
Detersione acida	Detergente antincrostante schiumogeno	2,0-5,0%	20-60°C	15 min	Applicare con il sistema a media pressione. Per superfici verticali procedere dall'alto verso il basso. Lasciare agire per 10 – 15 minuti. L'impiego regolare previene la formazione di incrostazioni

Fonte Ecolab S.r.l. - Food & Beverage, Italia.

2.3.2 Monitoraggio e validazione del piano di sanificazione

La verifica della corretta applicazione della procedura di sanificazione consiste in un controllo visivo pre-operativo, effettuato quotidianamente a inizio turno produttivo; tale ispezione, tuttavia, ha il limite di non poterne misurare l'effetto. La determinazione dell'efficacia, infatti, richiede una validazione periodica mediante programma di monitoraggio microbiologico ambientale, finalizzato alla valutazione analitica quantitativa (UFC/cm²) per gli indicatori di igiene di processo e qualitative (presenza/assenza) per i patogeni ricercati, tipici dell'industria alimentare (Sveum et al., 1992).

La validazione del processo di pulizia e disinfezione viene eseguita periodicamente secondo il piano di campionamento, che prevede l'esecuzione di analisi a rotazione su superfici prima e dopo le operazioni di sanificazione, al fine di verificare l'effettivo abbattimento delle cariche microbiche.

Un buon monitoraggio presuppone il campionamento nel punto più suscettibile alla contaminazione sulle superfici più problematiche per proprietà e permeabilità del materiale e condizioni di manutenzione (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 2019).

I parametri microbiologici usati per comprendere l'effettiva efficacia della sanificazione sono:

- carica batterica mesofila, coliformi totali e fecali, *E.coli*, streptococchi fecali, *Staphylococcus aureus*, intesi come indicatori di buone pratiche igieniche (ICMSF, 1986; Mossel D.A.A., 1989; OMS, 1976), e *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*, come patogeni.
- carica batterica mesofila aerobia allo scopo di avere un quadro generale dello stato igienico e per valutare se le pulizie eseguite sono efficaci e contribuiscono a contenere il livello di contaminazione e di crescita batterica (ICMSF, 1986; Orefice, 1984).
- Coliformi, al duplice scopo di avere un utile criterio di confronto e di valutazione da un lato della loro capacità (e in via deduttiva degli enterobatteri) di impiantarsi, sopravvivere e moltiplicarsi nelle condizioni offerte dagli ambienti in esame e dall'altro per ottenere informazioni di massima sulle condizioni igieniche (Orefice, 1984).
- *E. coli*, in quanto indicatore di originaria derivazione fecale e potenziale patogeno (OMS, 1976).
- Streptococchi fecali in relazione alla loro riconosciuta maggiore resistenza di sopravvivere in condizioni ambientali difficili (OMS, 1976), e come indicatori di contaminazione ambientale e fecale (Cantoni et al., 1984).
- *Staphylococcus aureus* nel suo duplice ruolo di indicatore di buone pratiche di pulizia e di potenziale patogeno (OMS, 1976).
- *Salmonella spp.* quale patogeno enterico a larga diffusione specie negli alimenti di origine animale.

2.4 PROCEDURE DI SANIFICAZIONE AZIENDALI

Le attività di pulizia e disinfezione (Cleaning and disinfection, C&D) dell'impianto e delle attrezzature della Grancarni S.r.l. sono delegate a una ditta esterna, autorizzata e specializzata in sanificazione nell'industria alimentare, che opera quotidianamente al termine delle lavorazioni.

La scelta dei detergenti e dei sanificanti, utilizzati secondo le modalità descritte dal produttore (concentrazione d'uso, tecnica di aspersione, tempi di attesa prima del risciacquo, stoccaggio, ecc.), è supportata dalla consulenza tecnica dell'azienda fornitrice e basata su considerazioni quali le caratteristiche chimico/fisiche dello sporco, la natura delle superfici da trattare, il tipo di attrezzatura a disposizione per le operazioni di C&D, il numero degli operatori in forza alla ditta e i tempi e la facilità d'impiego.

Il regolamento aziendale prescrive che, al termine delle attività produttive, gli operatori predispongano i locali e le attrezzature all'intervento degli addetti alla sanificazione, riponendo in aree dedicate utensili e macchinari che non si prestano al lavaggio con sistemi ad alta pressione.

Le operazioni di C&D hanno inizio dopo la messa in sicurezza dei quadri elettrici e delle prese di corrente, opportunamente coperti con teli di plastica, allo scopo di preservarne l'integrità funzionale. L'allontanamento dello sporco grossolano (ritagli, grasso, ossa e altri scarti) dalle superfici di lavoro, dai pavimenti e dalle pareti è essenziale e indispensabile per il successo dell'intera procedura, e avviene per mezzo di lance ad alta pressione e/o, manualmente, con spazzole e scope. Raccolti i residui all'interno di contenitori per lo smaltimento dei sottoprodotti di O.A. di Cat.3, gli operatori procedono con il prelavaggio di tutte le superfici con acqua a temperatura media di 55°C a bassa pressione. La soluzione detergente viene applicata con un tubo schiumogeno perché aderisca alle pareti e alle superfici; la schiuma viene lasciata in posa per il tempo indicato nella scheda tecnica e quindi allontanata con abbondante risciacquo. Segue la fase di disinfezione, che viene effettuata nebulizzando un disinfettante autorizzato a base alcolica, lasciato poi agire come da indicazioni del produttore. Al termine, con un secondo risciacquo con acqua a temperatura ambiente, si allontana la soluzione disinfettante e si procede con la verifica visiva di eventuali tracce di sporco residuo, prima di terminare la procedura con l'asciugatura delle apparecchiature con aria compressa, dei pavimenti con i tira acqua e delle superfici con carta assorbente monouso.

Con cadenza settimanale, allo scopo di limitare il rischio legato alla resistenza microbica ai biocidi chimici, è stato previsto l'impiego di un disinfettante a base di sali di ammonio quaternario, mentre per un'azione mirata alla distruzione del biofilm, mensilmente, viene applicata una procedura di C&D

alternativa a quella ordinaria, che prevede l'utilizzo di un detergente ecologico a formulazione trienzimatica schiumogena a base di proteasi, amilasi e lipasi.

Per prevenire e contrastare la contaminazione ambientale da batteri, spore, muffe e lieviti una volta al mese e secondo quanto previsto dal piano di sanificazione, inoltre, si procede con un trattamento intensivo con capsule fumiganti a base di ortofenilfenolo. Grazie agli eccipienti fumiganti, il principio attivo può diffondersi uniformemente in ogni angolo dell'impianto, neutralizzando i microrganismi sospesi e distruggendo, dopo sedimentazione, quelli presenti sulle superfici.

L'evidenza dell'effettiva esecuzione delle operazioni di C&D viene registrata dal personale addetto alla sanificazione su Moduli allegati al Manuale di Autocontrollo e monitorata dal Responsabile del Controllo Qualità aziendale.

L'efficacia delle procedure di sanificazione viene accertata su base semestrale, come previsto dal piano di campionamento. L'esito favorevole delle analisi su tamponi superficiale/ambientale, certificato dal rapporto di prova, permette la validazione dell'intero processo. Il mancato rispetto degli standard microbiologici indicati dalla letteratura per le superfici, eventualmente associato al superamento dei limiti previsti dal Reg. CE 2073/2005 e s.m.i. impone l'apertura di una non conformità e l'adozione di misure correttive e interventi straordinari e approfonditi di sanificazione, volti alla risoluzione della problematica riscontrata.

2.4.1 Procedura straordinaria di sanificazione con glutaraldeide

La gestione di un episodio di non conformità riscontrata a causa dell'isolamento di *Salmonella spp.* durante la validazione periodica del processo di sanificazione, ha richiesto la ricerca di una procedura per l'implementazione del sistema in uso. Consultati i tecnici dell'azienda fornitrice, è stata effettuata una prova di disinfezione straordinaria con glutaraldeide. La verifica analitica ha confermato l'efficacia del trattamento sperimentale, giustificando l'adozione permanente di questo potente disinfettante per operazioni periodiche di sanificazione ambientale.

La glutaraldeide è un disinfettante liquido incolore, di odore caratteristico e pungente, poco aggressivo sui materiali; è miscelabile con acqua e alcol e viene solitamente impiegata in ambito sanitario in soluzioni a concentrazione del 2% per sfruttarne l'azione biocida contro spore, virus, funghi e batteri, pur contenendo il rischio tossico associato all'irritazione delle mucose oculari e respiratorie.

Il trattamento con la glutaraldeide, procedurato nei minimi dettagli, viene effettuato al termine delle consuete operazioni di sanificazione da un operatore specificamente formato ed equipaggiato degli idonei dispositivi di protezione individuale (tuta, maschera facciale con filtri per polveri sottili, guanti). L'attrezzatura richiesta per il trattamento è composta da una valigetta contenente:

- un serbatoio, all'interno del quale viene introdotta la soluzione al 2% di glutaraldeide;
- una consolle di comando per la regolazione dei parametri di pressione e velocità di erogazione;
- un gruppo di nebulizzazione, costituito da due tubi che convogliano aria compressa e soluzione disinfettante, in un unico getto, attraverso sottilissimi ugelli.



Fig. 2.4 Attrezzatura per il trattamento con nebbia secca.

L'erogazione della soluzione disinfettante sfrutta il principio fisico della micronizzazione a freddo per la formazione di una nebbia secca e impalpabile, composta da particelle del diametro di 7-8 micron, che rimbalzano sulle superfici senza bagnarle. La nebbia diffonde rapidamente in tutti gli ambienti di produzione, ad esclusione delle celle in cui sono stoccati i prodotti alimentari, e rimane in sospensione fino a 12 ore, distribuendosi in maniera uniforme all'interno della struttura e bonificando le superfici. Il trattamento viene pianificato, solitamente, in corrispondenza del fine settimana per poter disporre del maggior tempo di azione possibile. Per eliminare gli effetti nocivi derivati dai fumi di glutaraldeide e consentire agli operatori un accesso in sicurezza ai locali di produzione, la struttura deve essere necessariamente arieggiata, mettendo in funzione il sistema UTA e aprendo tutti gli aditi verso l'esterno.

***CAPITOLO 3* LA RESISTENZA BATTERICA AI BIOCIDI**

3.1 RESISTENZA BATTERICA AI DISINFETTANTI CHIMICI

La diffusione della resistenza batterica è un fenomeno in crescita in tutto il mondo, in gran parte attribuibile all'uso improprio e/o all'abuso di antibiotici e disinfettanti (Bragg et al., 2014; Roca et al., 2015).

Esistono molte definizioni di resistenza ai biocidi (antisettici e disinfettanti), alcune delle quali considerano anche solo una piccola diminuzione della suscettibilità della flora contaminante alla loro azione (Maillard et al., 2013, Maillard 2007, Chapman et al., 1998; Cloete, 2003). Ciò contrasta con la definizione di resistenza riferita agli antibiotici chemioterapici, ossia a quel fenomeno naturale biologico di adattamento proprio di alcuni microrganismi, che acquisiscono la capacità di sopravvivere o di crescere in presenza di una concentrazione di un agente antibatterico generalmente sufficiente a inibire o uccidere microrganismi della stessa specie (Brauner et al., 2016). Con i biocidi vengono piuttosto utilizzati termini ed espressioni quali “resistenza”, “tolleranza”, “suscettibilità ridotta” e “insensibilità”, ma è giusto affermare che, da un punto di vista prettamente pratico, un batterio che sopravvive a un biocida è resistente a quel prodotto qualunque sia la sua concentrazione.

Oltre che nelle strutture sanitarie, i biocidi sono ampiamente utilizzati in ambito industriale e domestico per disinfettare, igienizzare, sterilizzare e preservare superfici e materiali a contatto con gli alimenti dalla contaminazione microbica (Kim et al., 2018b). Ciò rende allarmante il fatto che la resistenza ai disinfettanti stia crescendo a un ritmo tanto rapido (Bragg et al., 2014; Wassenaar et al., 2015) da giustificare la definizione di “malattia globale emergente” con cui è stata descritta (Roca et al., 2015). Le procedure di pulizia e disinfezione e l'uso dei biocidi sono di fondamentale importanza per la riduzione della contaminazione microbica negli impianti di produzione alimentare (Bragg et al., 2018). L'igiene dei locali e delle attrezzature, infatti, è una condizione essenziale, almeno quanto il ricorso a una materia prima di buona qualità, per ottenere un prodotto ineccepibile dal punto di vista igienico-sanitario (Bragg et al., 2018). Ciò soprattutto in considerazione dei volumi produttivi elevati e della richiesta del consumatore di cibi sani, poco lavorati, nutrienti e quanto più possibile privi di additivi (Moodie et al., 2013; Fardet, 2016; Condell et al., 2012).

La maggior parte dei biocidi ha più di un sito target (Denyer, 1995; Russell e Chopra, 1990; Poole, 2002); tuttavia, a basse concentrazioni o esposizioni inappropriate, l'azione antimicrobica può essere limitata a uno solo dei bersagli (Hugo, 1967; Russell e Maillard, 2000). In condizioni come questa è facile che il batterio metta in atto una via metabolica alternativa o sistemi di protezione, vanificando l'effetto del biocida e sviluppando resistenza (Hugo, 1967).

Lo sviluppo di resistenza batterica ai biocidi può essere favorito, ad esempio, dall'utilizzo di disinfettanti a concentrazioni errate (subletali) e/o per un tempo di esposizione insufficiente

(Muhterem-Uyar et al., 2015), considerando che per alcune molecole l'efficacia (calcolata in termini di tasso di riduzione della carica microbica) è direttamente proporzionale alla durata del contatto con le superfici da sanificare e che un'eradicazione incompleta, oltre a comportare fenomeni di resistenza sul lungo periodo, determina un rischio immediato di ricolonizzazione delle superfici trattate (Cerf et al., 2010).

L'efficacia dei biocidi è influenzata anche dalla stabilità nell'ambiente dei principi attivi, dalla temperatura del mezzo in cui agisce (acque di lavaggio), nonché dalla presenza di residui di lavorazione come esito di una preliminare fase di detersione non correttamente eseguita.

I residui di lavorazione, oltre a rappresentare un'ovvia fonte di ricontaminazione, riducono l'efficacia dei biocidi per via dell'interazione chimica con la frazione proteica; la componente lipidica, in più, può creare zone impermeabili alle soluzioni disinfettanti, all'interno delle quali possono sopravvivere e selezionarsi ceppi batterici resistenti, favorendo la formazione di nicchie biologiche e biofilm (Cerf et al., 2010).

Infine, la presenza di residui di lavorazione è problematica anche nella misura in cui determina un ostacolo allo scolo delle acque di risciacquo: l'uso di sistemi di pulizia idraulici ad alta pressione, infatti, in condizioni di deflusso rallentato, può provocare la dispersione di particelle di aerosol dalle acque di drenaggio, evidentemente contaminate, contribuendo alla diffusione incontrollata dei microrganismi negli ambienti di lavorazione (Thévenot et al., 2006).

La resistenza batterica è stata studiata *in vitro* contro diverse classi chimiche, inclusi i fenoli (Triclosan) (Sasatsu et al., 1993; Curiao et al., 2015), biocidi cationici (clorexidina, composti di ammonio quaternario) (Adair et al., 1971; Romão et al., 2005), isotiazolinoni (Winder et al., 2000) e biocidi più reattivi come gli iodofori (O'Rourke et al., 2003), agenti alchilanti (glutaraldeide) (Griffiths et al., 1997; Nomura et al., 2004) e diversi composti ossidanti (Martin et al., 2008; Dukan e Touati, 1996).

La resistenza ai biocidi può essere intrinseca o acquisita, ma comunque geneticamente determinata, e può essere associata a fattori quali permeabilità di membrana, attività delle pompe di efflusso, Capacità di formazione di biofilm e di degradazione enzimatica (Nikaido, 2003; Poole, 2007; Pu et al., 2016).

3.1.1 Meccanismi di resistenza intrinseca

La resistenza intrinseca è definita come quella proprietà naturale (innata) geneticamente determinata di un microrganismo che gli consente di minimizzare o annullare l'azione di un biocida.

L'efficacia dei biocidi a parità di condizioni di applicazione e utilizzo, infatti, varia notevolmente tra i batteri, alcuni dei quali possono essere intrinsecamente resistenti; considerando la variabilità

intraspecifica, inoltre, l'azione battericida di questi composti può differire anche tra ceppi diversi della stessa specie.

Permeabilità di membrana

Affinché un agente biocida raggiunga i suoi siti target (costituenti citoplasmatici, sistemi enzimatici, acidi nucleici, ecc.), deve essere in grado di attraversare gli strati cellulari esterni; tali strutture possono agire fisicamente come una barriera, limitando la quantità di biocida che entra nella cellula. I batteri Gram-negativi sono generalmente più tolleranti dei Gram-positivi agli agenti antibatterici e ai biocidi (Russell e Gould, 1988; Russell e Chopra, 1990) in virtù della composizione della membrana esterna (Nikaido e Vaara, 1985; Gilbert et al., 1990). Tale struttura è impermeabile alle macromolecole e permette solo una limitata diffusione di sostanze idrofobe attraverso la sua superficie ricoperta di lipopolisaccaride (LPS), mentre i canali transmembrana consentono il passaggio solo di piccoli composti idrofili (Nikaido, 1985; Nikaido, 1989; Nikaido e Vaara, 1985). Poiché molti agenti nocivi sono composti idrofobi o idrofili relativamente grandi, essi penetrano la membrana esterna in modo inadeguato o piuttosto scarso (Nikaido, 1976; Nikaido e Vaara, 1985).

Al contrario, la parete cellulare dei Gram-positivi, composta essenzialmente da peptidoglicano e acido teicoico, è estremamente permeabile a sostanze ad alto peso molecolare come i biocidi (Russell, 1991). La membrana citoplasmatica, d'altra parte, sebbene di natura lipoproteica, non ha dimostrato di agire come una barriera all'ingresso di agenti biocidi nel citoplasma, e ciò contribuisce a spiegare la maggiore suscettibilità dei batteri del gruppo.

Adattamento fenotipico

Anche l'adattamento fisiologico (fenotipico) all'ambiente e alle condizioni di crescita può migliorare la tolleranza batterica ai biocidi (Brown e Gilbert, 1993).

La capacità di produrre biofilm, in tal senso, è ragione della ridotta suscettibilità dei batteri stessi ai disinfettanti, dal momento che protegge la comunità batterica dagli stress ambientali (come le variazioni di temperatura e disidratazione), promuove le interazioni microbiche (quorum sensing) e lo scambio genetico (Wang et al., 2012), rende disponibili i principi nutritivi e allontana i prodotti tossici. (Daly et al., 1998; Hassett et al., 1999; McDonnell e Russell, 1999; Donlan, 2000; Mah e O'Toole, 2001).

3.1.2 *Meccanismi di resistenza acquisita*

La resistenza ai biocidi può essere anche acquisita, ossia sviluppata in un secondo tempo da batteri precedentemente sensibili, mediante l'acquisizione di fattori genetici mobili, presenti su elementi extracromosomici come plasmidi e trasposoni (Paulsen et al., 1993; Russell, 1997), o a seguito della mutazione (McMurry et al., 1999) o dell'amplificazione di geni cromosomici endogeni (Sasatsu et al., 1995)

Le mutazioni nei batteri sono generalmente casuali, ma possono essere condizionate da una pressione selettiva continua, come quella che si realizza in presenza di antimicrobici (Heat et al., 1998; McMurry et al., 1998, Webber et al., 2008, Parikh et al., 2000; Webber et al., 2015; Madigan et al., 2009). Attraverso il trasferimento verticale e orizzontale di materiale genetico (Davis et al., 2015), lo stress indotto sul batterio dall'azione dei biocidi può tradursi in meccanismi volti a prevenirne o limitarne l'effetto dannoso. La resistenza può manifestarsi sottoforma di riduzione dell'assorbimento (Russell e Chopra, 1990) e/o di aumento dell'eliminazione (McDonnell e Russell, 1999; Schweizer, 2001) oppure, in alternativa e meno comunemente, di biodegradazione enzimatica del composto (Bloomfield, 1988; Hugo, 1991; Ogase et al., 1992).

Data l'importanza dello stimolo esterno per la selezione naturale dei ceppi batterici, è probabile che lo studio degli isolati ambientali, più che dei ceppi di coltura standard, possa fornire informazioni importanti e rilevanti in termini di espressione di meccanismi di resistenza, alcuni dei quali ancora sconosciuti.

Mutazione genetica

L'acquisizione di geni di resistenza ai disinfettanti attraverso il trasferimento genico orizzontale (Ravi et al., 1999) è il meccanismo principale di selezione di una popolazione batterica meno suscettibile ai biocidi (Ochman et al., 2000; Partridge et al., 2018).

L'elasticità e la dinamicità conferite al genoma batterico dal trasferimento di materiale genetico a cellule non discendenti (Delihias, 2011) è alla base dell'evoluzione, dal momento che è in grado di modificare anche sostanzialmente l'ecologia e i fenotipi di patogenicità dei ceppi batterici stessi (Ochman et al., 2000; Johnson e Grossman, 2015).

I batteri acquisiscono fattori di resistenza dal pool genico batterico globale per mezzo di plasmidi, trasposoni, sequenze di inserzione, integroni e cassette geniche. (Partridge et al., 2018).

I *plasmidi* sono elementi genetici circolari auto-replicanti responsabili del rapido adattamento a condizioni di limitazione della crescita sul breve periodo e dell'acquisizione a lungo termine di altre proprietà, come ad esempio patogenicità, virulenza o resistenza (Bruto et al., 2017; San Millan, 2018). I *trasposoni* e le *sequenze di inserzione* sono tratti di DNA mobili, spesso associati a geni di resistenza temporanea, in grado di traslocare quasi casualmente in nuove posizioni sulla stessa o su diverse molecole di DNA, trasportando i geni di resistenza nella nuova posizione (Partridge et al., 2018). L'espressione dei geni presenti su tali sequenze può essere influenzata positivamente dalla presenza di un promotore o dal posizionamento a monte di un gene essenziale per il batterio (Vandecraen et al., 2017).

Le *cassette geniche* sono piccoli segmenti di DNA spesso inseriti in un *integrone* o in una struttura circolare libera (Delihias, 2011; Partridge et al., 2018), solitamente costituiti da uno o due geni e privi di un sito di ricombinazione e di un promotore (Partridge et al., 2018). Gli integroni possono quindi conferire ai batteri resistenza agli antibiotici e ai disinfettanti a seconda dei geni che trasportano (Gnanadhas et al., 2013; Templeton et al., 2009; Khan et al., 2016; Zhou et al., 2017; Kim et al., 2018b). Oltre che attraverso l'acquisizione di elementi genetici esogeni, i batteri possono sviluppare nel tempo resistenza ai disinfettanti attraverso il processo di adattamento genetico intrinseco (Bragg et al., 2018). Alterazioni genetiche intrinseche, come mutazioni o espressione genica differenziale dovute a stress antimicrobico, possono contribuire in modo significativo alla resistenza ai disinfettanti (Kim et al., 2018a). Il DNA di qualsiasi microrganismo può contenere sequenze geniche di resistenza minimamente espresse, stabilmente espresse o espresse in modo ottimale solo in determinate condizioni, come ad esempio in presenza di biocidi (Palmer et al., 2018). Il cambiamento nell'espressione genica può, quindi, diminuire la suscettibilità agli agenti antimicrobici attivando meccanismi di difesa latenti (Palmer et al., 2018). L'entità della resistenza antimicrobica conferita dall'espressione genica dipende dall'entità dell'influenza dei geni sull'azione antimicrobica (debolmente o fortemente protettiva), oltre che dal grado di espressione in condizioni di stress (Palmer et al., 2018).

Riduzione della permeabilità di membrana

L'esposizione ai biocidi può indurre cambiamenti nella struttura e nella composizione della parete e della membrana cellulare batterica che, determinandone una modifica della permeabilità (McDonnell e Russell, 1999), esitano in una riduzione dell'attività del biocida stesso (Alonso-Calleja et al., 2015; Tattawasart et al., 2000; Nikaido, 2003).

Tali cambiamenti sono essenzialmente riconducibili a variazioni dell'idrofobicità della superficie (Tattawasart et al., 1999), dell'ultrastruttura (Tattawasart et al., 2000) e della composizione proteica

(Gandhi et al., 1993; Winder et al., 2000) e degli acidi grassi (Jones et al., 1989; Guerin-Mechin et al., 1999; Mechin et al., 1999; Guerin-Mechin et al., 2000).

La repressione della biosintesi delle porine, per esempio, può determinare una parziale resistenza non-specifica agli antibiotici e ai biocidi (Karatzas et al., 2008; Zhang et al., 2010), limitandone il passaggio attraverso la membrana e quindi all'interno della cellula.

Aumento dei trasporti trans-membrana

Molte proteine di membrana sono coinvolte nei processi di trasporto di sostanze nocive in uscita dalla cellula (Poole, 2005, 2007; Lubelski et al., 2007).

In risposta a segnali ambientali o come esito di una mutazione, possono essere attivati loci genetici che, esitando in un aumento dell'efflusso, mediano la resistenza batterica (Maillard e Denyer, 2009; Martínez-Suárez et al., 2016; Sánchez et al., 2015).

Le pompe di efflusso, ad esempio, sono proteine transmembrana attraverso le quali la cellula allontana disinfettanti e alcuni antibiotici (Langsrud et al., 2003; Hegstad et al., 2010; Wassenaar et al., 2015), e rappresentano il principale e più frequentemente riscontrato meccanismo di resistenza ai biocidi (Chitsaz e Brown, 2017; Kim et al., 2018b)

Degradazione enzimatica

Processi di biodegradazione enzimatica mediati da enzimi quali catalasi e superossido-dismutasi, diminuiscono la suscettibilità batterica agli agenti ossidanti (Greenberg e Demple, 1989; Demple, 1996) e permettono, probabilmente in associazione ad altri meccanismi, la sopravvivenza delle cellule ai danni indotti dai biocidi (Martin et al., 2008).

3.1.3 Fenomeni di cross-resistenza

L'esposizione ai biocidi, pur a basse concentrazioni, produce sempre uno stress sui batteri, anche qualora intrinsecamente resistenti. La risposta batterica allo stress si traduce in un cambiamento nell'espressione genica (Knapp et al., 2016; Codling et al., 2004, Fernández-Cuenca et al., 2015; Sánchez et al., 2015, Bailey et al., 2009; Pumbwe et al., 2004, Curiao et al., 2016, McCay et al., 2010; Casado et al., 2016) e in particolare dei geni regolatori (McMurry, 1998; Curiao et al., 2015 Dukan e Touati, 1996; Davin-Regli et al., 2008; Bailey et al., 2009; Webber et al., 2008; Jang et al., 2008). Un'indicazione della risposta a tale pressione è data dalla cinetica della crescita microbica. L'aumento della fase di latenza o la diminuzione della crescita logaritmica sono indicatori dell'interazione tra

batteri e biocida e possono riflettere l'induzione/espressione di meccanismi che consentono ai batteri di ridurre la tossicità del biocida (Fawley e Wilcox, 2001; Thomas et al., 2005; Gomez Escalada et al., 2005) e di riparare i danni subiti.

Lo studio del genoma batterico ha permesso di constatare che alcuni dei meccanismi che riducono la suscettibilità ai biocidi sono controllati e indotti dagli stessi geni regolatori che, modulando l'espressione genica, determinano anche i meccanismi di resistenza agli antibiotici (Dempse, 1996; Koutsolioutsou et al., 2005). Il fatto che alcuni determinanti genetici coinvolti nella resistenza ai biocidi possano essere fisicamente legati a quelli responsabili della resistenza agli antibiotici è alla base delle preoccupazioni sull'impatto che l'uso dei biocidi nell'industria alimentare può avere nella prevalenza e diffusione di resistenza antimicrobica dei principali batteri patogeni (Templeton et al., 2009; Khan et al., 2016).

Come suggerito da alcuni autori, tuttavia, tale correlazione potrebbe non essere particolarmente problematica poiché l'espressione dei meccanismi di resistenza ai biocidi potrebbe essere transitoria e non tradursi in una mutazione stabile del genoma batterico: alcuni studi hanno infatti dimostrato una diminuzione della suscettibilità batterica ai biocidi, e talvolta agli antibiotici, solo in presenza del biocida stesso (Knapp et al., 2013; Wesgate et al., 2016; Sánchez et al., 2015).

La tolleranza ai biocidi è stata rilevata in ceppi di *S. aureus* meticillina-resistenti (MRSA) isolati da fonti animali (Bjorland et al., 2001, 2003) e alimentari (Sidhu et al., 2001) e spesso coinvolti nelle infezioni umane (Gould et al., 2012).

Nei ceppi MRSA, che spesso mostrano una resistenza multipla agli antibiotici, e in particolare in quelli che presentano geni codificanti fattori di resistenza alla gentamicina, è stato dimostrato l'aumento di funzionalità di sistemi di efflusso di sostanze ad azione biocida (Emslie et al., 1985; Jones e Midgley, 1985). La presenza di stafilococchi tolleranti ai disinfettanti negli animali, negli alimenti e in generale lungo tutta la filiera alimentare, desta preoccupazione almeno quanto la possibile diffusione di fattori di resistenza tra i ceppi, dal momento che potrebbero essere causa della sopravvivenza, crescita e diffusione di stafilococchi enterotossigeni e/o di stafilococchi di rilevante importanza clinica. Stafilococchi tolleranti ai composti di ammonio quaternario, isolati da ambienti di produzione e prodotti alimentari (Sundheim et al., 1992; Heir et al., 1995), si sono rivelati resistenti a diversi antibiotici, soprattutto ai β -lattamici (Heir et al., 1999). Le sequenze geniche che codificano per tali fattori di resistenza sono state identificate su plasmidi comuni sia agli Stafilococchi da campioni alimentari che clinici (Sidhu et al., 2001, 2002), a riprova del fatto che l'uso di biocidi per la disinfezione negli ospedali, negli allevamenti e nell'industria alimentare è in grado di selezionare stafilococchi resistenti alla penicillina e viceversa.

È stata segnalata una ridotta suscettibilità ai composti di ammonio quaternario anche in *L. monocytogenes* isolate da alimenti o ambienti di produzione (Møretrø et al., 2017).

L'esposizione di *L. monocytogenes* a concentrazioni inidonee di biocidi ha selezionato mutanti che mostrano anche una ridotta suscettibilità agli aminoglicosidi (Christensen et al., 2011), nonché alla kanamicina e alla gentamicina (Romanova et al., 2006), comunemente usata nella terapia clinica per la listeriosi umana.

La capacità di trasferimento intraspecifico di plasmidi recanti geni che codificano per fattori di resistenza è preoccupante se si pensa che specie di *Listeria* non patogene, come *L. innocua* e *L. welshimeri*, più comuni di *L. monocytogenes* negli ambienti di lavorazione, possono comunque contribuire alla selezione di specie patogene tolleranti ai disinfettanti (e forse anche da metalli pesanti) e, potenzialmente, agli antibiotici (Katharios-Lanwermyer et al., 2012; Ratani et al., 2012). La tolleranza multipla associata al DNA extracromosomico è risultata trasferibile non solo tra listerie, ma anche tra *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

L'azione selettiva operata dai biocidi è stata osservata anche in *Salmonella spp.*, dal momento che i meccanismi di resistenza multipla agli antibiotici (MAR) sono piuttosto comuni nei batteri Gram-negativi.

In *S. Typhimurium*, il fenotipo MAR media l'attivazione delle pompe di efflusso e conferisce una riduzione significativa (da 4 a 8 volte) della suscettibilità agli antibiotici (Randall et al., 2008), come β -lattamici, cloramfenicolo, fluorochinoloni e tetracicline, oltre che una maggiore tolleranza ai solventi organici (White et al., 1997) e ai disinfettanti.

A sostegno della relazione esistente tra i loci genetici che codificano per fattori di resistenza agli antibiotici e per quelli di resistenza ai biocidi, in uno studio condotto su ceppi di *Salmonella spp.* isolati da carne di pollo (Thorrold et al., 2007) è stato osservato che l'attività delle pompe di efflusso era caratteristica tipica ed esclusiva dei ceppi MAR.

La corretta esecuzione delle procedure di pulizia e disinfezione, la rotazione dei prodotti disinfettanti e l'utilizzo di soluzioni biocide contenenti più di un principio attivo a concentrazioni sufficienti a debellare tutta la flora microbica contaminante, sono strategie che possono contribuire a prevenire la diffusione di batteri tolleranti ai biocidi nella food chain. Determinante, allo stesso modo, è l'attuazione di programmi di monitoraggio specifici, per valutare non solo l'efficacia delle operazioni di disinfezione, ma anche l'eventuale persistenza e diffusione di batteri tolleranti ai biocidi e agli antibiotici biocidi o co-tolleranti (Ortega Morente et al., 2013).

3.2 IL BIOFILM

Il biofilm microbico è un ecosistema estremamente complesso costituito da microrganismi immersi in una sostanza polimerica extracellulare, o matrice, da essi stessi prodotta e adesa a una superficie che conferisce loro protezione dall'ambiente esterno. (Meyer, 2015). Si tratta, quindi, di un sistema biologico con un alto livello di organizzazione interna, in cui i batteri sono strutturati in una comunità funzionale; la copresenza frequente di due o più specie diverse (Meyer, 2015) all'interno del medesimo biofilm facilita associazioni e protezione mutualistiche o sinergiche tra i microrganismi (Costerton e Lappin-Scott, 1989). Tale matrice può essere fissata su superfici dure (attrezzature, superfici, ecc.) oppure a strutture biologiche (residui di lavorazione, ecc.).

Oltre ai microrganismi, immersi nella matrice organica del biofilm si possono trovare anche cristalli minerali e particelle di corrosione originate dalle superfici di adesione, biotiche o abiotiche (Percival et al., 2000). Tali elementi non si dispongono in uno strato compatto, ma la struttura complessiva del biofilm è caratterizzata dalla presenza di numerosi spazi interstiziali, "microcanali" che hanno lo scopo di favorire il passaggio di nutrienti, il rilascio e l'allontanamento di prodotti del catabolismo e la diffusione di molecole di segnale intercellulari, svolgendo un ruolo fondamentale nel controllo del processo di formazione dei biofilm (Roy et al., 2018).

È ormai ampiamente risaputo che il biofilm rappresenti la modalità di crescita e sopravvivenza tipica dei batteri, tanto negli ecosistemi naturali quanto in quelli antropici (Mc Dougald et al. 2011; Villa e Cappitelli, 2013). Le cellule comprese nel biofilm esprimono caratteristiche fenotipiche specifiche che conferiscono loro importanti vantaggi ecologici, come l'adattabilità ai cambiamenti ambientali (Stewart e Franklin, 2008) e una maggiore resistenza a condizioni avverse, (es. limitata disponibilità di nutrienti, alterazioni di pH, temperatura e umidità) (Rinaudi e Giordano, 2010), oltre che ai disinfettanti e ad altri biocidi.

La transizione delle cellule batteriche dalla forma planctonica a quella sessile è caratterizzata da profondi cambiamenti fisiologici, indotti da stimoli ambientali e geneticamente controllati (D'Abrosca et al., 2018).

3.2.1 *Struttura del biofilm*

La matrice influenza le proprietà fisiche del biofilm, tra cui diffusività, conduttività termica e proprietà reologiche. Indipendentemente dalla densità di carica o dal suo stato ionico (condizionati dalla natura dei polisaccaridi che la compongono), la matrice influenza anche processi fisico-chimici, come la diffusione e la resistenza all'attrito, e contribuisce ad aumentare le concentrazioni locali di composti ionici. Nei biofilm prodotti da batteri Gram-negativi, infatti, la matrice è principalmente composta da polisaccaridi neutri o polianionici, che le conferiscono proprietà anioniche e la capacità di trattenere cationi bivalenti come calcio e magnesio (Flemming et al., 2000; Sutherland, 2001); i biofilm che contengono principalmente batteri Gram-positivi, al contrario, sono caratterizzati da una matrice a proprietà principalmente cationica.

La matrice promuove le forze coesive, un maggiore assorbimento di nutrienti e metalli pesanti (Bryers, 1984; Marshall, 1992), il sequestro di prodotti microbici e altri microrganismi, la protezione delle cellule dai cambiamenti ambientali, la fornitura di un mezzo per la comunicazione intercellulare e il trasferimento di materiale genetico.

La matrice del biofilm è composta da esopolisaccaridi, DNA extracellulare (eDNA) e proteine (Flemming et al., 2007).

Gli *esopolisaccaridi* (EPS) sono polimeri ad alto peso molecolare composti da unità di ripetizione complesse, sintetizzati a livello intracellulare e secreti nell'ambiente esterno (Nwodo et al., 2013). Se osservati al microscopio elettronico, gli EPS sembrano lunghi filamenti lineari o ramificati, che dalle superfici cellulari si protendono a formare grandi impalcature per l'adesione di carboidrati, proteine, acidi nucleici e lipidi. Gli EPS si differenziano gli uni dagli altri per la natura, i legami e le sostituzioni dei monomeri di cui sono costituiti. La diversità dei polisaccaridi microbici conferisce loro caratteristiche piuttosto diverse, che si riflettono in modo determinante sulla struttura complessiva del biofilm (Rabin et al., 2015).

Le *proteine extracellulari* sono un altro importante componente della matrice EPS (Frølund et al., 1996). Alcune proteine sono adese alle superfici dei microrganismi e ai polisaccaridi e coadiuvano la formazione e la stabilizzazione del biofilm. Altre invece, di natura enzimatica, sono coinvolte nei processi di degradazione di polisaccaridi, proteine, acidi nucleici, cellulosa, lipidi e altri componenti inclusi della matrice, fornendo risorse di carbonio e di energia alle cellule del biofilm (Zhang e Bishop, 2003). Gli enzimi intervengono anche nella fase di distacco e dispersione del biofilm, consentendo il rilascio delle cellule e l'avvio di un nuovo ciclo (Rabin et al., 2015).

Il *DNA extracellulare* (eDNA) non proviene solo dalle cellule lisate (Whitchurch et al., 2002), ma è anche attivamente secreto dalle cellule del biofilm. (Hamilton et al., 2005). L'eDNA ha un ruolo importante nella formazione del biofilm, di cui influenza soprattutto l'iniziale fase di adesione interagendo con i recettori sulla superficie del substrato (Das et al., 2010). A causa della sua carica negativa, inoltre, l'eDNA è in grado di chelare cationi metallici e alcuni antibiotici carichi positivamente.

L'eDNA ha un ruolo essenziale nell'evoluzione batterica e nello sviluppo di fattori di resistenza. Il biofilm, infatti, limitando la mobilità batterica e aumentando la densità cellulare, rappresenta un ambiente ottimale per lo scambio di materiale genetico indipendente (plasmide), che può codificare per fattori di resistenza agli antibiotici. Non a caso, il tasso di trasferimento genico orizzontale è significativamente più alto nei biofilm rispetto alle cellule planctoniche (Hausner e Wuertz, 1999).

3.2.2 Sviluppo del biofilm

Lo sviluppo del biofilm è un processo complesso e dinamico a più fasi, dipendente da una serie di variabili tra cui il tipo di microrganismo, la superficie di adesione, le condizioni ambientali e l'espressione dei geni essenziali del biofilm (Carpentier e Cerf, 1993; Dunne, 2002). Specie batteriche differenti, infatti, possono formare biofilm differenti in condizioni identiche; allo stesso modo, è possibile che una medesima specie batterica possa formare strutture di biofilm diverse in diverse condizioni ambientali. Il biofilm maturo, non di meno, è capace di rispondere in modo dinamico e di adattarsi fenotipicamente, geneticamente e strutturalmente a condizioni interne ed esterne in costante cambiamento. I batteri nei biofilm, comunque, possono in qualsiasi fase percepire segnali ambientali specifici e porre fine alla formazione del biofilm (Tolker-Nielsen, 2015).

Il processo di formazione del biofilm è suddivisibile in 5 fasi (Palmer e White 1997):

1. Condizionamento e colonizzazione della superficie
2. Adesione delle cellule alla superficie
3. Costruzione del biofilm
4. Maturazione del biofilm
5. Distacco e dispersione cellulare

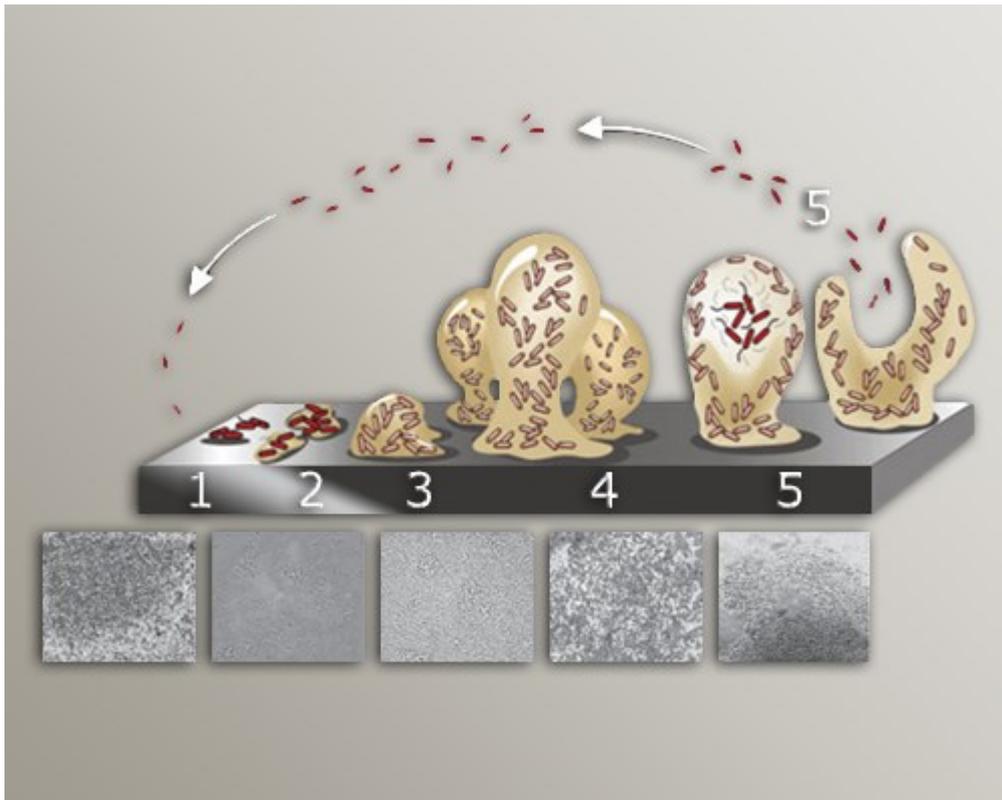


Fig. 3.1 Rappresentazione schematica delle fasi dello sviluppo del biofilm batterico.

Fonte, Palmer e White, 1997.

I microrganismi non aderiscono direttamente al substrato, ma piuttosto a un film di condizionamento, uno strato umido costituito da polisaccaridi, glicoproteine e composti umici (Chamberlain, 1992; Marshall et al., 1971; Baier, 1980; Rittle et al., 1990) che determina una modificazione chimica della superficie originale, influenzando così la velocità e l'entità dell'adesione microbica (Mittelman, 1996). Il *condizionamento* della superficie consiste nell'adsorbimento al substrato di sostanze (soluti o particolato) che ne modificano le proprietà fisico-chimiche. Il film di condizionamento, inoltre, rappresenta una fonte concentrata di nutrienti e oligoelementi che, stimolando l'adesione delle cellule planctoniche e favorendone la crescita, agevolano la colonizzazione della superficie.

In seguito al condizionamento superficiale avviene l'adesione dei microrganismi al substrato. L'*adesione*, in un primo momento reversibile in virtù del debole legame delle cellule alla superficie, diventa irreversibile quando ha inizio la produzione di matrice EPS (Renner e Weibel, 2011)

L'adesione batterica sembra essere correlata alla distanza tra il microrganismo e la superficie (Busscher e Weerkamp, 1987). A circa 10-20 nm, infatti, le cariche negative sulla superficie batterica vengono respinte dalle cariche negative presenti sulla maggior parte delle superfici ambientali. Questa

repulsione elettrostatica può, tuttavia, essere bilanciata e superata, a distanze minori, dalle forze attraenti di Van der Waals, nonché dall'uso di fimbrie e flagelli (Palmer e Flint, 2007).

Altri fattori che condizionano la formazione del biofilm sono l'uniformità del substrato e le sue intrinseche proprietà fisico-chimiche. Generalmente, all'aumentare della rugosità della superficie aumenta anche l'adesione batterica (Characklis et al., 1990a), in ragione della protezione offerta dalle micro-irregolarità agli effetti delle forze di taglio, nonché dell'aumento dell'interfaccia disponibile (Characklis et al., 1990b). D'altro canto, l'adesione dei microrganismi è più rapida su superfici idrofobiche e non polari, come il teflon e i materiali plastici, rispetto a substrati idrofilici, come il vetro o i metalli (Pringle e Fletcher, 1983; Bendinger et al., 1993; Percival e Thomas, 2009). Determinanti, in ultimo, sono ancora la velocità del flusso del mezzo liquido a contatto con la superficie di adesione e le sue turbolenze, nonché la maggiore o minore presenza di nutrienti al suo interno (Donlan, 2002).

Tab. 3.1 Fattori che condizionano lo sviluppo di un biofilm microbico.

Proprietà del substrato	Proprietà del mezzo a contatto	Proprietà del Microrganismo
Consistenza o ruvidezza	Velocità del flusso	Idrofobicità della superficie
Composizione chimica	Valore di pH	Presenza di appendici (fimbrie, flagelli)
Idrofobicità	Temperatura	EPS
Condizionamento della superficie	Presenza di antimicrobici naturali	Autoinduttori del QS

Fonte Donlan, 2002.

Stabilita un'adesione permanente, può iniziare la fase di *costruzione* del biofilm: i batteri che hanno colonizzato la superficie crescono e avviano la sintesi dei polimeri della matrice, fino ad esserne incorporati e immobilizzati.

Ulteriori microrganismi possono essere inglobati all'interno o fissati sulla superficie del biofilm. Col progredire del processo di costruzione, la conformazione spaziale del biofilm cambia, trasformandosi da strato sottile a struttura tridimensionale a forma di "fungo" o "torre" (Rabin et al., 2015).

All'interno della compagine del biofilm, i microrganismi possono determinare, con il proprio metabolismo, condizioni che favoriscono la crescita e la selezione di altre specie microbiche. Con l'aumentare dell'eterogeneità del biofilm, infatti, si sviluppano microgradienti chimici e fisici, come quelli di pH, ossigeno e nutrienti, e ciò porta alla definizione di gruppi funzionali fisicamente separati, ma in connessione interattiva, che scambiano metaboliti e definiscono tra loro rapporti di cooperazione sinergica (Blenkinsopp e Costerton, 1991) o di competizione antagonista (Connell e Slatyer, 1977; Fredrickson, 1977).

La *maturazione* del biofilm è regolata dal quorum-sensing (QS), un meccanismo che consente ai batteri di prendere decisioni collettive, sincronizzarsi con il resto della popolazione e quindi funzionare e comportarsi come organismi multicellulari (Waters e Bassler, 2005).

Il QS sincronizza l'espressione genica in risposta alla densità cellulare della popolazione (*quorum*), percepita (*sensing*) da ciascun microrganismo mediante la misurazione della concentrazione di specifiche molecole di segnale, chiamate "autoinduttori", secrete dai membri della comunità (Solano et al., 2014).

Il *distacco* del biofilm, ultima fase del processo, può verificarsi a causa di fattori quali mancanza di nutrienti, concorrenza intensa, densità di popolazione eccessiva e accumulo di cataboliti, e interessare l'intero biofilm o solo una sua parte.

La dispersione cellulare, coordinata dal QS, può essere determinata dall'interruzione della sintesi delle molecole che compongono la matrice EPS, dalla loro degradazione o ancora dalla rottura dei legami chimici che ne stabilizzano la struttura. Il rilascio di batteri e il ritorno alla vita planctonica hanno una rilevanza fondamentale, dal momento che promuovono l'inizio di un nuovo ciclo e lo sviluppo del biofilm in altri siti e nuove nicchie (Rabin, 2015).

3.2.3 *Biofilm e meccanismi di resistenza batterica*

Le differenze nella struttura del biofilm possono dar luogo a determinanti risposte fenotipiche al trattamento antibiotico. Il biofilm, cioè, può conferire ai batteri caratteristiche di resistenza: è stato stimato che le cellule del biofilm possono essere fino a 10.000 volte più resistenti agli antibiotici e ai disinfettanti rispetto alle cellule che vivono in condizioni planctoniche (Costerton et al., 1995; Nickel et al., 1985; Luppens et al., 2002).

La resistenza attribuibile al biofilm è un fenomeno multifattoriale e sinergico; i meccanismi attraverso cui si realizza la minore suscettibilità alle sostanze ad azione biocida variano a seconda dell'agente antimicrobico e dello stadio di sviluppo e condizioni di crescita del biofilm (Ito et al., 2009; Alhede et al., 2011; Bowler et al., 2012; Haaber et al., 2012; Stewart, 2015) e includono diffusione limitata degli antimicrobici, attività fisiologica differenziale, induzione di meccanismi di tolleranza specifici la formazione di cellule persistenti (Ciofu e Tolker-Nielsen, 2010).

Ridotta penetrazione delle sostanze antimicrobiche

La matrice EPS svolge un ruolo importante nella resistenza agli antibiotici. Comportandosi come una barriera chimico-fisica, l'EPS ha un ruolo è in grado di ridurre la penetrazione di diverse sostanze chimicamente reattive, antibiotici cationici e peptidi antimicrobici (AMPs). La limitazione nel trasporto è dovuta alla saturazione della matrice EPS, carica negativamente, da parte degli antibiotici, carichi positivamente (Venkatesan et al., 2015), e dipende dal legame delle molecole ai siti reattivi del biofilm. Una volta che questi siti sono saturi, infatti, la penetrazione dei composti antimicrobici può riprendere. I composti proteici della matrice e le proteine dei residui di alimenti intrappolati nel biofilm, d'altro canto, possono reagire chimicamente con i composti clorati, determinando un calo più o meno drastico della concentrazione di cloro attivo che si libera e, di conseguenza, una riduzione della sua efficacia. È un aspetto di notevole interesse, considerando che i detergenti e i disinfettanti alcalini clorati sono largamente impiegati nelle procedure di sanificazione delle industrie alimentari.

Trasferimento genico orizzontale

La resistenza agli antibiotici può essere acquisita, come detto, tramite mutazioni geniche casuali. Nell'ambito del biofilm, la frequenza con cui si realizza il trasferimento plasmidico orizzontale è molto più alta che tra le cellule planctoniche. Studi sui biofilm di *S. aureus* hanno dimostrato l'esposizione sub-letale di antibiotici β -lattamici favorisce il trasferimento di plasmidi coniugativi (Laureti et al., 2013).

Fenotipo biofilm-specifico

In seguito all'adesione, i microrganismi possono andare incontro a cambiamenti metabolici e fenotipici: ne è una prova il fatto che la virulenza espressa dai batteri inclusi nel biofilm è generalmente più spiccata di quella delle controparti planctoniche (Mah e O'Toole, 2001; Saye, 2007). L'induzione di un fenotipo biofilm-specifico resistente ai biocidi può determinare, ad esempio, l'espressione di meccanismi attivi, come la sintesi di glucani periplasmatici, per sequestrare gli antibiotici (Gilbert et al., 1997; Maira-Litran et al., 2000; Percival e Bowler, 2004). In questo senso va interpretata anche la sovraregolazione dell'espressione delle pompe di efflusso, in grado di estrarre farmaci, solventi organici, ioni metallici tossici e altri ligandi dall'ambiente intracellulare.

Gradiente fisiologico all'interno del biofilm

I microgradienti all'interno del biofilm determinano una diversificazione delle specie batteriche all'interno del biofilm, che presentano attività metabolica e sensibilità agli antimicrobici diverse a

seconda della disponibilità di nutrienti e ossigeno. I microrganismi in fase stazionaria o latente, situati negli strati più profondi del biofilm, risultano insensibili all'azione di antibiotici, come i β -lattamici e le tetracicline, o disinfettanti la cui efficacia dipende dal tasso di crescita e di replicazione batterica (Davies, 2003).

Cellule persister

Le cellule incorporate nel biofilm possono essere metabolicamente dormienti e pertanto fenotipicamente attrezzate per persistere in ambienti ostili (Anwar et al.1992; Rhoads et al., 2007). Queste cosiddette “cellule persister” rappresentano una piccola sottopopolazione a crescita lenta del biofilm che si è differenziata in uno stato inattivo, ma estremamente resistenti a quegli antibiotici che prendono di mira i processi rilevanti per la crescita o la divisione cellulare (Roberts e Stewart, 2005; Percival et al., 2011).

È stato stimato che le cellule persister costituiscano lo 0,1-10% del totale della popolazione del biofilm e che siano in grado di avviarne la ricostruzione al termine di un'eventuale pressione antimicrobica esterna (Harrison et al., 2005; Roberts e Stewart, 2005).

Riassumendo, nei primi stadi dello sviluppo del biofilm, si susseguono cambiamenti nell'espressione genica che portano alla determinazione del cosiddetto “fenotipo biofilm-specifico”, associato ad un aumento della resistenza ai biocidi. La successiva produzione di matrice extracellulare contribuisce alla sopravvivenza delle cellule, ritardando l'entrata delle sostanze antimicrobiche nello spessore del biofilm. La maturazione del biofilm e l'aumento della densità cellulare, ancora, creano gradienti di nutrienti e ossigeno che inducono la riduzione dell'attività metabolica e del tasso di crescita delle specie microbiche a seconda della loro localizzazione all'interno della matrice, oltre che della risposta generale allo stress e dell'espressione genica più marcata delle pompe di efflusso (Drenkard, 2003).

3.2.4 Biofilm nell'industria alimentare - innovative strategie di intervento

Il biofilm è causa di problematiche importanti nell'industria alimentare: oltre ai danni agli impianti, di cui è potenzialmente in grado di ridurre l'efficienza operativa, il biofilm costituisce un serio pericolo per la salute pubblica se i microrganismi coinvolti appartengono a specie patogene per l'uomo (come *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus*) e vengono trasferiti agli alimenti in seguito al contatto con le superfici contaminate.

La microscopia elettronica a scansione ha dimostrato che molti microrganismi patogeni e alteranti sono in grado di aderire e formare biofilm su superfici in acciaio inossidabile, alluminio, vetro, gomma, teflon e nylon, i materiali più comunemente utilizzati nell'impiantistica alimentare, in modo particolare quando sono presenti fessurazioni o irregolarità superficiali in cui le cellule possono insinuarsi e sopravvivere alle operazioni di sanificazione (Abdallah et al., 2014; Colagiorgi et al., 2017). Tali "nicchie" trattengono anche piccoli residui di materiale organico, che insieme all'acqua favoriscono lo sviluppo microbico e la costruzione del biofilm.

L'industria alimentare moderna dispone classicamente di metodi fisici (es. vapore, ultrasuoni) e numerosi composti chimici (es ipoclorito di sodio, idrossido di sodio, perossido di idrogeno, acido peracetico, ecc.) per eliminare il biofilm da superfici, attrezzature e impianti (Srey et al., 2013). Tuttavia, la consapevolezza che i biofilm sono comunità complesse, che godono della capacità di sviluppare continue e nuove resistenze, rende essenziale la ricerca e lo sviluppo di strategie innovative incentrate sulla prevenzione della formazione del biofilm, piuttosto che sulla sua eliminazione (Gopal et al., 2015). Un esempio è dato dalle strategie basate sull'utilizzo di composti antisettici, sull'impiego di agenti capaci di interferire con i sistemi di *quorum sensing* o capaci di disgregare la matrice polisaccaridica prodotta dai microrganismi (Roy et al., 2018).

Oli essenziali

Diversi composti derivati da piante hanno dimostrato di possedere proprietà antibiofilm. Un utile vantaggio relativo all'uso di questi composti nei trattamenti di sanificazione è la percezione positiva che i consumatori ne hanno, in contrasto con i disinfettanti chimici tradizionali, soprattutto nelle applicazioni dell'industria alimentare. Gli oli essenziali vegetali sono principalmente una miscela complessa specie-specifica di monoterpenoidi, sesquiterpenoidi e flavonoidi (Raffaella et al., 2017).

Distruzione enzimatica

Gli enzimi rappresentano un'innovativa alternativa *green* per il controllo del biofilm, in virtù delle loro caratteristiche di biodegradabilità e bassa tossicità (Torres et al., 2011; Huang et al., 2014).

Gli enzimi impiegati a tale scopo appartengono alla classe delle proteasi (es. serin proteasi, pepsina e tripsina), delle glicosidasi (es. amilasi, cellulasi e pectinasi) e delle nucleasi, attive contro i componenti principali della struttura del biofilm. (Boels, 2011; Huang et al., 2014; Coughlan et al., 2016; Meireles et al., 2016). Una volta degradato dall'azione enzimatica, il biofilm può essere completamente rimosso con trattamenti meccanici (es. ultrasuoni) ed è più sensibile all'azione dei sanificanti (Coughlan et al., 2016).

Nonostante la comprovata efficacia e il ridotto impatto ambientale, l'applicazione su scala industriale di queste alternative enzimatiche è ad oggi ostacolata dall'elevato costo dei trattamenti, principalmente a causa della tutela dei brevetti.

Funzionalizzazione delle superfici

Un approccio promettente è quello che sfrutta le applicazioni pratiche delle nanotecnologie. Le nanoparticelle (NPs) esercitano la loro azione senza penetrare la membrana cellulare e sono perciò in grado di eludere la maggior parte dei meccanismi di resistenza batterica agli antibiotici (Beyth et al., 2015). Le NPs possono essere coniugate ad atomi, materiali o altre NPs, per migliorarne le proprietà o attribuirne altre in vista di nuove applicazioni pratiche (Rai et al., 2015).

Una strategia interessante nella lotta al biofilm nell'industria alimentare consiste nello sfruttare l'efficacia di alcuni materiali nanocompositi per ridurre l'adesività batterica (Wu et al., 2011).

L'adesività batterica è influenzata da molteplici proprietà chimiche e fisiche della superficie, tra cui idrofobicità, carica elettrica e gruppi funzionali (Campoccia et al., 2013).

Tale attività repellente può essere conferita alle superfici a contatto con gli alimenti da un rivestimento di materiali intrinsecamente antibatterici e antibiofilm (Swartjes e Veeregowda, 2016). Le superfici funzionalizzate (ad es. con lisozima) hanno mostrato proprietà antibatteriche e antibiofilm di grande interesse industriale (Huang et al., 2016; Gu et al., 2017).

Biosurfattanti

I biosurfattanti sono composti naturali, generalmente di origine microbica, in grado di modificare le caratteristiche idrofobiche della superficie batterica, alterandone le proprietà adesive e la permeabilità, determinando morte cellulare per rigonfiamento irreversibile (Zhang et al., 2017; Zhao et al., 2017).

Le superfici dell'industria alimentare, trattate con biosurfattante, risultano perciò meno suscettibili all'adesione batterica e, di conseguenza, alla contaminazione da biofilm. (Coronel-León et al., 2016).

Batteriofagi

I batteriofagi, o fagi, sfruttano l'apparato biosintetico dei batteri per replicarsi e, in seguito all'infezione, ne inducono la morte per lisi. L'attività dei batteriofagi è mirata esclusivamente alle cellule procariotiche, ed è perciò innocua per l'uomo, gli animali e le piante (Panconesi, 1951).

La principale limitazione dei trattamenti con i fagi è legata alla loro limitata capacità di penetrare nelle profondità del biofilm; tuttavia, alcuni di essi possiedono un corredo enzimatico in grado di disgregare i componenti della matrice, migliorando la diffusibilità (Pires et al., 2016; Parasion et al., 2014; Shen et al., 2013; Gutiérrez et al., 2014).

Il rapporto di sinergia/antagonismo tra fagi e disinfettanti convenzionali e/o le temperature comunemente utilizzate nell'industria alimentare, sono fattori che possono influenzare l'efficacia di un simile trattamento. Un'altra questione rilevante è l'effetto su biofilm formati da specie diverse, comunemente presenti sulle superfici dell'industria alimentare (Gutiérrez et al., 2016).

Sebbene l'uso dei batteriofagi come agenti antibiofilm abbia già portato ad applicazioni commerciali. (Fister et al., 2016; Iacumin et al., 2016), sono necessarie ulteriori ricerche prima della loro completa implementazione nelle procedure di cleaning nell'industria alimentare (Gutiérrez et al., 2016).

***CAPITOLO 4* SCOPO DELLA TESI**

In linea con i programmi di ricerca e sviluppo di strategie innovative di lotta ai microrganismi potenzialmente presenti negli ambienti di produzione dell'industria alimentare, scopo della tesi è stato la valutazione dell'attività antimicrobica e anti-biofilm di una molecola di nuova sintesi, appartenente al gruppo dei peptidi antimicrobici naturali (AMPs) e denominata ai fini della descrizione di questi studi PEP1.

L'attività sperimentale ha puntato a verificare l'efficacia di tale peptide, già descritta in precedenza contro *Listeria monocytogenes* (Palmieri et al., 2018), nei confronti di batteri patogeni Gram⁺ e Gram⁻ quali, rispettivamente, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*.

Lo studio, inoltre, si è focalizzato sulla funzionalizzazione del peptide e sulla valutazione dell'attività antimicrobica di nanobiocomplessi risultanti dalla coniugazione covalente di AMP PEP1 alla superficie di nanoparticelle ibride polimero-oro (AuNPs), preliminari all'applicazione come sanitizzanti di nuova generazione nel comparto dell'industria agro-alimentare.

***CAPITOLO 5* DISEGNO SPERIMENTALE E RISULTATI**

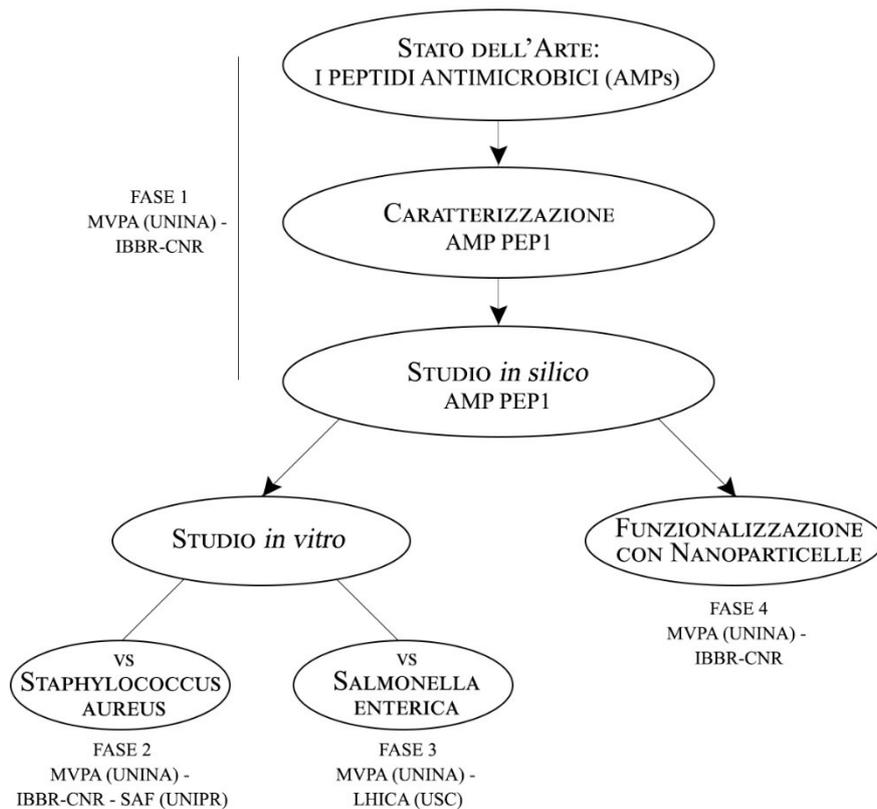


Fig. 5.1 Le fasi dell'attività sperimentale.

MVPA (UNINA): Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali,
Università degli Studi di Napoli Federico II

IBBR-CNR: Istituto di Bioscienze e Biorisorse - Consiglio Nazionale delle Ricerche

SAF: Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma (UNIPR)

LHICA: Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos, Universidad de Santiago de Compostela (USC).

FASE 1

5.1 I PEPTIDI ANTIMICROBICI

Oltre a nuovi composti chimici con comprovata attività antimicrobica e/o antibiofilm, così costosi che solo pochi possono essere trovati sul mercato (Mishra et al., 2017; O'Neill, 2015), la scienza dei materiali propone due approcci antibatterici alternativi. Uno si basa sull'uso di nanoparticelle metalliche (oro e argento) o semiconduttrici (ossido di titanio e ossido di stagno) (Palmieri et al. 2017), l'altro prevede la progettazione di brevi sequenze peptidiche, che si ripiegano in modo specifico in una struttura funzionale in presenza di una membrana cellulare. La capacità antibatterica delle nanoparticelle di metallo e ossido di metallo può essere attribuita al rilascio di ioni metallici liberi con conseguente danno alla membrana cellulare, interazioni del DNA e generazione di radicali liberi (Hemeg, 2017).

I peptidi antimicrobici (AMPs) sono piccole molecole proteiche (100 residui amminoacidici al massimo) largamente diffuse in natura, appartenenti alla componente umorale dell'immunità innata di numerosi organismi del regno animale e vegetale (De Smet e Contreras, 2005). Rappresentano, in effetti, una delle prime forme evolute e riuscite di difesa non specifica delle cellule eucariotiche contro le infezioni sostenute da un ampio spettro di microrganismi patogeni (Bals, 2000; Zasloff, 2002, Henzler Wildman et al., 2003).

Sono stati descritti centinaia di AMPs (Hancock et al., 1995; Kleinkauf e von Dohren, 1988; Perlman e Bodansky, 1971), isolati da batteri, insetti, molluschi, crostacei, anfibi, pesci, uccelli e mammiferi, uomo compreso, e classicamente suddivisi in due grandi gruppi, a seconda che siano o meno sintetizzati a livello ribosomiale. Gli AMPs con sintesi non-ribosomiale sono spesso drasticamente modificati e sono in gran parte prodotti da batteri, mentre gli altri, detti anche "naturali", sono prodotti da tutti gli organismi (compresi i batteri) come componente principale della difesa innata e non specifica (Hancock and Chapple, 1999). Il prodotto di un gene codificante per un AMP è un pre-pro-peptide, un precursore poi scisso proteoliticamente in un composto più piccolo (10-60 residui amminoacidici) e quindi stabilizzato mediante amidazione C-terminale, isomerizzazione di amminoacidi o accoppiamento di cisteina (Raimondo et al., 2005).

L'efficacia e la selettività degli AMPs sono legate alle proprietà fisico-chimiche di queste molecole, tra cui la natura anfipatica, la carica netta (carica netta positiva da +2 a +9), l'idrofobicità e la flessibilità conformazionale (Falcigno et al., 2016; Palmieri et al., 2016; Zelezetsky e Tossi, 2006). Quest'ultimo aspetto è stato ampiamente studiato grazie al dicroismo circolare (CD), un tipo di spettroscopia di assorbimento che fornisce informazioni sulla struttura di molti tipi di macromolecole biologiche

misurando la differenza di assorbimento della luce polarizzata circolarmente a sinistra e a destra. Gli spettri CD possono essere analizzati, infatti, per fornire un'immagine della struttura proteica di un peptide, delle caratteristiche strutturali secondarie regolari, come α -elica e foglietto- β , e delle variazioni strutturali indotte per esempio da pH, calore, ecc., nonché dei processi di *folding/unfolding* proteico.

5.1.1 Meccanismo d'azione

La letteratura scientifica vanta numerosi studi sui meccanismi di azione dei peptidi antimicrobici (Brogden e Brogden, 2011; Mika et al., 2011; Nguyen et al., 2011). Ad oggi, è generalmente riconosciuto che la membrana citoplasmatica sia l'obiettivo principale, oltre che primario dei peptidi antimicrobici, la cui attività può dirsi specifica nei confronti dei batteri proprio in virtù delle differenze riscontrabili tra le membrane cellulari delle cellule eucariotiche e procariotiche in termini di carica e composizione (Epanand e Vogel, 1999). L'interazione iniziale con la membrana cellulare è soggetta alle forze elettrostatiche che si instaurano tra le cariche positive dell'AMP e quelle negative della superficie batterica. I peptidi che agiscono mediante azione litica sfruttano la loro natura anfipatica per aumentare la permeabilità della membrana, alterandone la funzionalità fino a compromettere irreversibilmente la sopravvivenza della cellula target (Brogden, 2005). Nel caso dei batteri Gram-negativi, i peptidi antimicrobici dapprima interagiscono con la membrana esterna del lipopolisaccaride anionico, ne interrompono la struttura e accedono a quella interna. Nel caso dei batteri Gram-positivi, invece, l'attrazione elettrostatica determina il legame tra AMPs e acidi teicoici anionici della parete cellulare, cui consegue l'accumulo dei peptidi sulla superficie batterica e quindi la loro diffusione verso la membrana citoplasmatica interna.

In ogni caso, dopo l'interazione iniziale con la membrana interna, i peptidi antimicrobici si organizzano in semplici strutture polimeriche, i cosiddetti canali peptidici, che ne interrompono la continuità.

Sono stati descritti tre meccanismi attraverso cui tali molecole riescono a destabilizzare la membrana cellulare batterica. Nel modello *toroidal pore* il riarrangiamento dei peptidi associati ai lipidi determina la formazione di pori. Le teste polari dei lipidi di membrana sono in contatto con i peptidi che, inseriti perpendicolarmente al doppio strato, fanno ripiegare la membrana stessa verso l'interno fino a formare un poro misto.

Anche il *modello barrel-stave* prevede la formazione di pori, ma in questo caso i pori sono creati mediante un assemblaggio circolare di peptidi anfipatici a livello transmembrana, in modo tale che i

loro domini idrofobici puntino verso le catene lipidiche della membrana e le porzioni idrofiliche, al contrario, puntino verso l'interno del poro.

Il modello *carpet-like*, che è stato ipotizzato per la traslocazione cellulare di peptidi antimicrobici, prevede un'iniziale associazione del peptide con la superficie della membrana; i peptidi, disposti parallelamente alla membrana, si aggregano e rivestono aree della membrana stessa (avvolgendole come un tappeto), determinando una riorganizzazione dei lipidi e un'interruzione della membrana (Campagna et al., 2007).

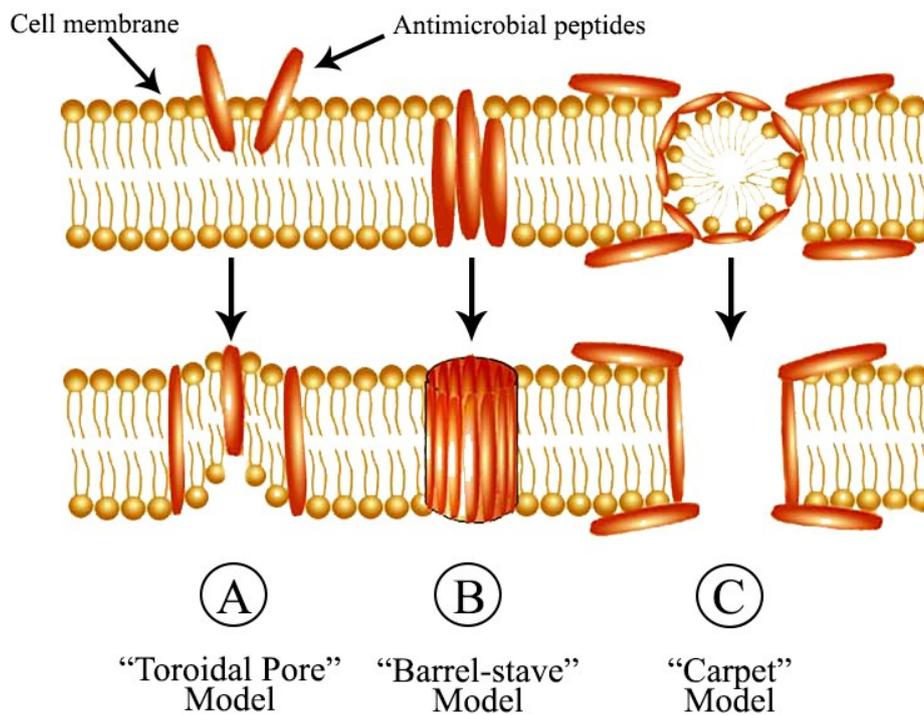


Fig. 5.2 Modelli di permeabilizzazione della membrana batterica.

Alcuni peptidi, che invece agiscono con meccanismo non litico, ruotano dalla faccia esterna a quella interna della membrana, attraversandola; una volta penetrati a livello citoplasmatico, tali peptidi si legano elettrostaticamente a un bersaglio vitale, compromettendo l'equilibrio dell'ambiente interno della cellula (Park et al., 2000). L'azione di AMPs disturba alcuni specifici processi cellulari, determinando l'inibizione della sintesi degli acidi nucleici, degli enzimi coinvolti nella modificazione degli amminoglicosidi e di diversi componenti strutturali della cellula, o ancora il blocco della sintesi e del corretto *folding* proteico (Boehr et al., 2003).

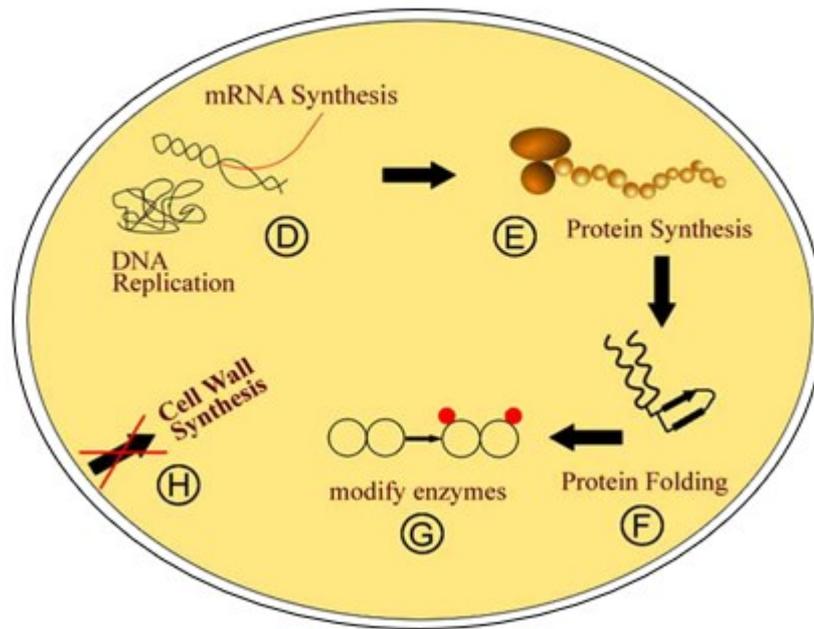


Fig. 5.3 Meccanismi d'azione di AMPs su bersagli intracellulari.

Non è comunque da escludere che alcuni AMPs possano presentare più di un meccanismo d'azione, come la destabilizzazione della membrana cellulare combinata con l'inibizione di uno o più bersagli intracellulari, in dipendenza della struttura e della composizione in residui amminoacidici. A tal proposito, è giusto sottolineare come una singola sostituzione amminoacidica in un AMP, pur non alterando profondamente le proprietà biofisiche e quindi l'azione della molecola, possa però modificare drasticamente il suo spettro antimicrobico (Seshadri Sundararajan et al., 2012; Fan et al., 2016; Waghu et al. 2016; Wang et al., 2016).

5.1.2 AMP IDR-1018

La famiglia degli AMPs comprende peptidi che mostrano di possedere anche attività antibiofilm. Tali molecole sono solitamente brevi sequenze anfipatiche con un numero elevato di residui basici (R o K) e almeno il 50% di amminoacidi idrofobici (Amer et al., 2010; de la Fuente-Núñez et al., 2012, 2014; Overhage et al., 2008; Pompilio et al., 2011) e si dimostrano efficaci contro il biofilm batterico a concentrazioni inferiori rispetto alla concentrazione minima inibente (MIC), ossia la più bassa concentrazione in grado di inibire la crescita batterica visibile, per le cellule planctoniche (Amer et al., 2010; de la Fuente-Núñez et al., 2012, 2014; Overhage et al., 2008; Pompilio et al., 2011).

Recentemente, Hancock et al. hanno sviluppato un peptide chiamato regolatore di difesa innato (*Innate Defence Regulator*) IDR-1018, che mostra un'attività antibiofilm ad ampio spettro (de la Fuente-Núñez et al., 2012, 2014; Reffuveille et al., 2014). IDR-1018 è un peptide naturale di 12 aminoacidi (VRLIVAV-RIWRR-NH₂) derivato della bactenecina, il peptide di difesa dell'ospite bovino (HDP), appartenente alla famiglia delle catelicidine. Diversi studi, condotti negli ultimi anni, attribuiscono funzioni rilevanti a questo peptide, e specificamente:

- i) attività antibiofilm verso un ampio spettro di batteri patogeni (de la Fuente-Núñez et al., 2012, 2014; Reffuveille et al., 2014);
- ii) induzione dei linfociti e regolazione della produzione di citochine (Pena et al., 2013; Wieczorek et al., 2010);
- iii) riduzione delle infezioni tissutali (Wieczorek et al., 2010).

L'attività antimicrobica di IDR-1018 è stata dimostrata contro numerosi batteri Gram-negativi e Gram-positivi, con valori MIC compresi tra 5 e 260 µg/ml, (de la Fuente-Núñez et al., 2014; Reffuveille et al., 2014; Wiecezorek et al., 2010).

5.1.3 Studio *in silico* AMP PEP1

Questa fase sperimentale è stata svolta in collaborazione con l'Istituto IBBR del CNR di Napoli. L'approccio *in silico* ha permesso la progettazione ex novo tramite software, a partire dal peptide IDR-1018, di una molecola che si prevede sia altamente stabile e dotata di evidente effetto antimicrobico utilizzata negli studi e che chiameremo PEP1. Tutte le posizioni amminoacidiche nella sequenza IDR-1018 sono state mutate sequenzialmente, introducendo un residuo di K per aumentare ulteriormente la carica positiva, uno dei fattori più critici per migliorare la potenziale interazione di agenti antimicrobici con la membrana esterna dei batteri.

I peptidi progettati *in silico* sono stati poi analizzati dagli strumenti di calcolo sul sito Web del database dei peptidi antimicrobici (Wang et al., 2016) e dagli strumenti ProtParam sul portale delle risorse bioinformatiche di ExPASy. La valutazione dell'indice di Boman (Radzicka e Wolfenden, 1988), misura dell'affinità del peptide alle proteine e della sua capacità di stabilire interazioni biologiche, ha permesso di identificare se e quale mutazione avesse prodotto una riduzione della potenziale attività del peptide antimicrobico.

PEP1 mostra un'alta selettività nei confronti dei batteri, probabilmente a causa delle differenze nella composizione in lipidi complessi della membrana cellulare procariotica. È stato ampiamente riportato in letteratura scientifica che i peptidi antimicrobici cationici possono legarsi preferenzialmente al doppio strato fosfolipidico caricato negativamente delle cellule batteriche rispetto a quelli nel loro complesso neutri delle cellule eucariotiche (Jiang et al., 2008). Questi risultati dimostrano ulteriormente i potenziali vantaggi che si possono ottenere utilizzando formulazioni per applicazioni cliniche e biotecnologiche, comprese dunque quelle nel settore dell'industria alimentare.

Molti articoli recenti riportano di AMPs naturali legati a nanoparticelle metalliche, principalmente oro o argento (Morales-Avila et al., 2017; Li et al., 2014), o caricati in nanocarrier porosi (Kwon et al., 2017), che mostrano attività antibatterica contro patogeni umani (principalmente *Escherichia coli*). Sono state quindi progettate nanoparticelle ibride polimero-oro (AuNP) mediante coniugazione covalente di peptidi alla superficie AuNP utilizzando la chimica della carbodiimmide.

FASE 2

5.2 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA E ANTIBIOFILM DI AMP PEP1 vs S. AUREUS.

Questa fase sperimentale è stata condotta in collaborazione con l'Istituto IBBR del CNR e il Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco dell'Università di Parma.

Scopo di questo studio è stata la valutazione dell'attività antimicrobica e anti-biofilm di PEP1 nei confronti di ceppi di riferimento e isolati da matrice alimentare di *Staphylococcus aureus*, al fine di valutare il potenziale uso e l'efficacia di questo peptide nella lotta contro tale patogeno responsabile di malattia a trasmissione alimentare.

5.2.1 Materiali e Metodi

MATERIALI

In questo studio sono stati utilizzati due ceppi di riferimento dalla raccolta ATCC, ossia lo *S. aureus* sensibile alla meticillina (MSSA) ATCC 35556, noto produttore di biofilm su polistirene (Di Ciccio et al., 2015; Thompson et al., 2010) e lo *S. aureus* resistente alla meticillina (MRSA) ATCC 33591, ceppo noto per la sua forte capacità adesiva (Gowrishankar et al., 2016).

Inoltre, è stato incluso in questo studio un ceppo enterotossigeno di *S. aureus* isolato da formaggio (SA₁). Tutti i terreni di coltura, se non diversamente specificato, sono stati acquistati da Oxoid (Milano, Italia). Per il lavaggio e il risciacquo dei batteri è stata utilizzata una soluzione salina tamponata con fosfato (PBS).

METODI

1. Test dell'attività antibatterica

La concentrazione minima inibente (MIC) e la concentrazione minima battericida (MBC) sono state determinate con il metodo della microdiluizione in brodo, seguendo le raccomandazioni del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). Le colture batteriche testate sono state coltivate su Tryptic Soy Agar (TSA) a 37°C per 24 ore. Le colonie isolate sono state quindi inoculate in Tryptic Soy Broth (TSB), cresciute per 16 ore a 37°C e diluite a 5×10^5 UFC/ml in Muller Hinton Broth (MHB-II;

Liofilchem, Italia). I batteri sono stati trattati con AMP PEP1 (compreso tra 0,156 e 80 μ M) in 100 μ l terreno di coltura (MHB-II) per 16 ore a 37°C. La crescita cellulare è stata misurata dall'assorbanza a 620 nm tramite un lettore di micropiastre (Victor, PerkinElmer, Waltham, MA). La MIC è definita come la più bassa concentrazione del peptide a cui non è stata rilevata alcuna crescita batterica. Per determinare la MBC, 50 μ L di sospensione cellulare batterica sono stati prelevati sulla base dei valori di MIC e coltivati su piastre TSA. Le cellule batteriche sono state enumerate dopo incubazione a 37°C per 24-48 ore. La MBC è definita come la concentrazione più bassa di peptide necessaria a uccidere oltre il 99,9% delle cellule batteriche. Il test è stato eseguito almeno sei volte per ogni ceppo e tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

2. Inibizione della formazione di biofilm

La capacità di PEP1 di prevenire la formazione di biofilm è stata valutata in piastre per microtitolazione in polistirene a fondo piatto a 96 pozzetti (SPL Life Sciences, Corea). Secondo il metodo descritto da Stepanović et al. (2007), con leggere modifiche, 200 μ L di *S. aureus* ATCC 35556, MRSA ATCC 33591 o *S. aureus* isolato da matrice alimentare (SA₁), diluiti serialmente in TSB fino alla concentrazione di 5x10⁶ UFC/mL, sono stati inoculati in ciascun pozzetto delle piastre per microtitolazione, in cui è stato poi aggiunto il peptide alla concentrazione di 80 μ M. Le piastre sono state quindi incubate a 37°C per 24 ore. Dopo l'incubazione, il surnatante è stato scartato e ogni pozzetto è stato lavato tre volte con 300 μ L di soluzione PBS sterile. I batteri rimanenti sono stati termofissati (60°C, 60 minuti) e poi colorati con 150 μ L di crystal violetto al 2% (Laboratori Conda, Madrid, Spagna) per 20 minuti. Dopo la colorazione, i batteri sono stati risciacquati con acqua corrente. La micropiastre è stata asciugata all'aria a temperatura ambiente e il colorante fissato alle cellule è stato risolubilizzato, distribuendo 150 μ L di etanolo al 95% in ciascun pozzetto (reagenti Carlo Erba, Milano, Italia). La densità ottica (OD) di ciascun pozzetto colorato con crystal violetto è stata misurata a 540 nm con un lettore di piastre per microtitolazione (Victor, PerkinElmer, Waltham, MA). Il test è stato eseguito almeno sei volte per ogni ceppo e tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

In base ai valori di OD dei controlli negativi, il valore soglia (OD_c) è stato stabilito secondo la formula:

$$OD_{\text{media}} + 3 * \text{Deviazione standard.}$$

Il valore OD (controllo, trattato con PEP1) è espresso come valore medio sottratto del valore OD_c.

3. Determinazione della concentrazione minima di eradicazione del biofilm

Il saggio della concentrazione minima di eradicazione del biofilm (MBEC) è stata eseguito per testare la sensibilità di biofilm preformati di *S. aureus* ATCC 35556, MRSA ATCC 33951 o SA₁ all'azione di PEP1 (Ceri et al., 2001). In breve, 150µl di inoculo batterico alla concentrazione di 10⁵ UFC/ml sono stati aggiunti ai pozzetti a fondo piatto di una piastra per microtitolazione (Nunc, Roskilde, Denmark). Quindi, le piastre sono state chiuse con un coperchio a 96 pioli (coperchi Immuno TSP; Nunc, Roskilde, Denmark), sigillate con Parafilm[®] e posizionate su un agitatore per microtitolazione (agitatore per microtitolazione digitale MTS 2/4, IKA-Works, Staufen im Breisgau, Germania), impostato su 150 rotazioni al minuto (rpm), in atmosfera umidificata (40%) a 37°C (G-Cell 115, Fratelli Galli, Milano, Italia) per 24 ore, per consentire la formazione di biofilm sui pioli. Successivamente, i batteri in forma planctonica sono stati rimossi risciacquando il coperchio in 200µl di soluzione PBS sterile. I biofilm così formati sui pioli sono stati quindi immersi in 200µl di soluzione PBS contenenti PEP1 a concentrazioni note (da 0,25 a 80µM) ed esposti alla sua azione per 24 ore a 37°C. Dopo l'esposizione, il coperchio è stato risciacquato per 1 minuto, trasferito su una nuova piastra per microtitolazione contenente 200 µl/pozzetto di TSB fresco e poi sonicato per 15 minuti (Ultrasonik 57H; NEY, USA), al fine di disperdere le cellule dalla superficie del piolo (piastra di recupero). Dopo la sonicazione, 50µl sono stati utilizzati per preparare diluizioni seriali poi piastrate (20µl) su TSA. Il coperchio a pioli è stato quindi scartato e la piastra di recupero è stata coperta con un normale coperchio e incubata per 24 ore a 37°C. La MBEC è definita come la concentrazione minima di PEP1 utile a eradicare il biofilm batterico dopo un periodo di recupero di 24 ore a 37°C. Il test è stato eseguito almeno quattro volte per ogni ceppo e tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

4. Test di eradicazione del biofilm

Per il test di eradicazione del biofilm, sono stati allestiti 150µl di inoculo di *S. aureus* ATCC 35556, MRSA ATCC 33591 e *S. aureus* da matrice alimentare (SA₁) a una concentrazione di 10⁵ UFC/ml. I biofilm, in formazione su coperchio a pioli, sono stati incubati per 24 ore a 37°C, in agitatore a 150 rpm. Quindi, le cellule sono state esposte all'azione di PEP1 (80µM) in differenti tempi di contatto, da 1 minuto a 48 ore a 37°C. Le cellule sono state recuperate in TSB mediante sonicazione a temperatura ambiente per 15 minuti. Un'aliquota da ciascun pozzetto è stata piastrata su TSA e poi la piastra per microtitolazione è stata incubata a 37°C per 24 ore. Dopo l'incubazione, l'OD è stata rilevata utilizzando un lettore di micropiastre (Victor, PerkinElmer, Waltham, MA), mentre la lettura delle piastre di TSA è stata eseguita dopo 24 ore di incubazione a 37°C. Il conteggio delle cellule formanti il biofilm, espresso in Log₁₀ UFC/piolo, è stato calcolato con la seguente formula:

$$\text{Log}_{10} [(X \cdot B - 1) (D) + 1]$$

dove:

X è il numero delle colonie su piastra,

B è il volume di TSB piastrato

D è la diluizione.

Il test è stato eseguito almeno sei volte per ogni ceppo e tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

5. Spettroscopia di dicroismo circolare

La struttura secondaria dei peptidi è stata studiata mediante spettroscopia di dicroismo circolare (CD) attraverso uno spettropolarimetro Jasco J-810 (Tokyo, Giappone). I campioni di peptidi a diverse concentrazioni (40, 60 e 80 μM in PBS) sono stati caricati in una cuvette di quarzo con lunghezza del percorso di 0,1 cm (Hellma Analytics, Milano, Italia) e gli spettri sono stati registrati a 25°C nell'intervallo di 190 nm – 260 nm a velocità di scansione di 20 nm/min, su una media di 5 scansioni e in presenza di SDS da 3mM come ambiente che simula la membrana. Per analizzare gli spettri di dicroismo circolare ottenuti nelle diverse condizioni sperimentali, il contributo dei tre elementi di struttura secondaria (α -elica, foglietto- β e bobina casuale) alla struttura complessiva del peptide è stato stimato dal sito DICHROWEB (Lobley et al., 2002; Whitmore e Wallace, 2004, 2008) utilizzando l'algoritmo CDSSTR (Sreerama e Woody, 2000; van Stokkum et al., 1990) e il web server BeStSel (Beta Structure Selection), liberamente accessibile all'indirizzo <http://bestsel.elte.hu/index.php> (Micsonai et al., 2018).

6. Microscopia elettronica a scansione

L'architettura tridimensionale del biofilm di *S. aureus* ATCC 35556 esposto a PEP1 è stata studiata utilizzando la microscopia elettronica a scansione (SEM). I biofilm sono stati incubati per 24 ore e quindi esposti a PEP1 (80 μM), come descritto in precedenza, per 16 ore a 37°C. I pioli sono stati rimossi dal coperchio utilizzando una lama sterilizzata a fiamma e le cellule sono state fissate con glutaraldeide al 2,5% (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) in PBS a 4°C per 16 ore. I campioni sono stati lavati per 5 minuti per tre volte con soluzione PBS e disidratati con alcol a concentrazione crescente (50% - 99% di etanolo; reagenti Carlo Erba, Milano, Italia) a temperatura ambiente. I

campioni sono stati essiccati sotto cappa per 72 ore e poi rivestiti con uno strato di palladio dorato, utilizzando un dispositivo di rivestimento SCD 040 (Balzer Union, Liechtenstein). I campioni sono stati osservati utilizzando un microscopio elettronico a scansione Zeiss DSM 950 a una tensione di accelerazione di 10 kV (Zeiss, Oberkochen, Germania). Le immagini sono state elaborate per la visualizzazione utilizzando Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose, CA).

7. Analisi Statistiche

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando GraphPad Prism version 7.04 per Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Il tasso di inibizione del biofilm ($OD_{\text{media } 540\text{nm}}$) per ciascun ceppo è stato esaminato utilizzando il *t-test per campioni indipendenti*. Il tasso di eradicazione del biofilm (conta vitale del biofilm in ogni tempo della sperimentazione, espressa in Log_{10} UFC/piolo) per ogni ceppo è stato esaminato utilizzando un test di Kruskal-Wallis, con un test post-hoc di Dunn usato per identificare le differenze individuali rispetto al controllo non trattato (PBS) per ciascun ceppo in ogni tempo sperimentale. In tutti i casi, la significatività è stata indicata con una probabilità di $p < 0.05$.

5.2.2 *Risultati e Discussione*

1. Attività antimicrobica di PEP1 su cellule planctoniche di *S. aureus*

Il peptide antimicrobico PEP1 è riuscito a inibire la crescita dei due ceppi di riferimento di *S. aureus*, MSSA ATCC 35556 e MRSA ATCC33591, nonché quella del ceppo selvaggio SA₁, al valore MIC di 20 μ M. Per studiare ulteriormente l'attività antimicrobica del peptide, è stato valutato anche il valore MBC. In particolare, la MBC è risultata essere di 20 μ M, un valore significativamente sovrapponibile a quello di MIC. Ciò suggerisce la considerazione che tale composto abbia una modalità di azione battericida contro *S. aureus* ATCC 35556, MRSA ATCC 33591 e SA₁. Inoltre, un confronto con il peptide originario IDR-1018 ha rivelato che il valore MIC di AMP PEP1 è pari alla metà della concentrazione richiesta da IDR-1018 per inibire completamente la crescita di un ceppo MRSA (cioè 40 μ M), come riportato da de la Fuente-Núñez et al. (2014), il che mostra un miglioramento nelle prestazioni di inibizione cellulare di PEP1.

2. Valutazione dell'attività di PEP1 contro la formazione di biofilm di *S. aureus*

Considerando quanto siano problematiche le contaminazioni associate al biofilm di stafilococco in fatto di trattamenti sanificanti mirati a distruzione ed eradicazione, si è deciso di testare la capacità di AMP PEP1 di prevenire la formazione di biofilm. A tal fine, i tre ceppi inclusi nello studio sono stati coltivati in forma planctonica in assenza o presenza di una concentrazione di peptide pari a 80µM. Come mostrato in Fig. 5.4, la quantificazione della biomassa ha confermato la forte capacità dei due ceppi di riferimento (MSSA ATCC 35556 e MRSA ATCC 33591) di produrre biofilm, nonché la moderata capacità di formazione di biofilm del ceppo enterotossigeno SA₁. Il confronto con il campione controllo non trattato fa emergere la straordinaria capacità di PEP1 di ridurre la biomassa del biofilm di tutti i ceppi di *S. aureus* (*t*-test non accoppiato; $p < 0,0001$). Il peptide ha inibito con successo la formazione di biofilm in ciascuno dei ceppi, come confermato dai valori di OD dei campioni trattati (tutti al di sotto del valore soglia di OD che definisce la formazione di biofilm), rivelando così un forte impatto anti-biofilm di PEP1 sui patogeni di origine alimentare oggetto del saggio sperimentale. Ulteriori indagini hanno chiaramente suggerito che è necessaria una concentrazione di peptide di almeno 80µM per prevenire completamente la formazione di biofilm da parte di tutti i ceppi di interesse.

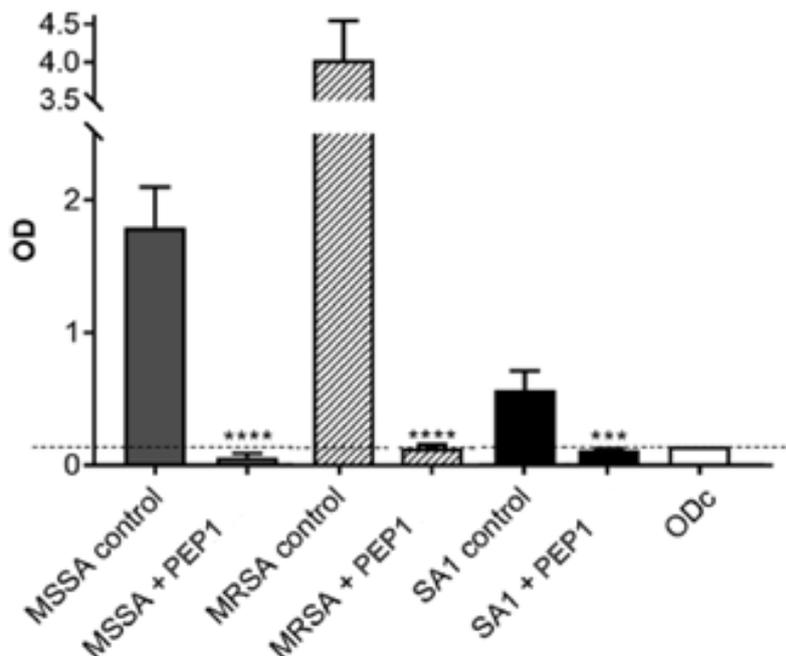


Fig. 5.4 Capacità di inibizione della produzione di biofilm di PEP1 vs *S. aureus*

Inibizione della produzione di biofilm nei ceppi di MSSA ATCC 35556, MRSA ATCC 33591 e *S. aureus* SA1 da parte di PEP1 [80µM]. I valori medi di OD sono mostrati con barre di errore che rappresentano la deviazione standard. *** indica una differenza significativa ($p < 0,001$) tra i campioni trattati e quelli di controllo. La linea tratteggiata indica il valore di cut off OD (ODc), che definisce la formazione del biofilm.

3. Determinazione della concentrazione minima di eradicazione del biofilm (MBEC)

Parallelamente, è stato importante valutare la potenziale applicazione di PEP1 nell'eradicazione di biofilm preformato. In questo contesto, i risultati ottenuti hanno mostrato che un'eradicazione completa del biofilm di *S. aureus* ATCC 35556 è stata raggiunta quando il peptide è stato utilizzato alla concentrazione di 80 μM , per quanto una concentrazione di 40 μM , pari al doppio della MIC, dia già in grado di determinare una riduzione di 1,7 Log_{10} UFC/piolo della biomassa del biofilm. Allo stesso modo, anche i biofilm di MRSA ATCC 33591 e SA₁ sono stati completamente eliminati utilizzando il peptide alla stessa concentrazione di 80 μM . AMP PEP1, pertanto, non solo ha confermato la sua capacità di inibire la formazione di biofilm, ma ha anche mostrato una forte attività di eradicazione contro i biofilm di stafilococco preformato.

4. Cinetica di azione di PEP1 contro i biofilm stabilizzati di *S. aureus*

La variazione della quantità di biomassa durante il trattamento con peptidi è stata ulteriormente esaminata per indagare la cinetica di azione di AMP PEP1. Come riportato in Fig. 5.5, la densità delle cellule di *S. aureus* MSSA ATCC35556, MRSA ATCC 33591 e SA₁ nei biofilm è stata ridotta già dopo 1 minuto di esposizione. In particolare, nel caso di MSSA ATCC 35556 e SA₁ è stata osservata l'interruzione completa delle superfici cellulari del biofilm dopo 5 minuti, indicando un'efficacia battericida rapida e sostanziale di AMP PEP1 ($p < 0,0001$). D'altra parte, sebbene una riduzione significativa delle cellule vive (quasi il 50%, $p = 0,0015$) nei biofilm MRSA ATCC 33591 sia stata osservata dopo 5 minuti, la completa eradicazione del biofilm è stata apprezzata dopo 15 minuti di esposizione al peptide ($p < 0,0001$). L'assenza definitiva e conclamata di cellule vitali è stata rilevata in un intervallo di tempi di sperimentazione che va da 30 minuti a 48 ore di incubazione.

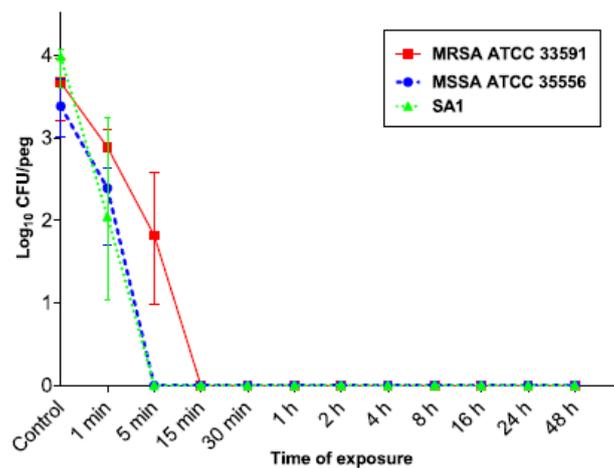


Fig. 5.5 Attività di eradicazione di PEP1 su biofilm preformato di *S. aureus*.

Mediana e barra di errore dell'attività di eradicazione di PEP1 (80 microMol) verso il biofilm prodotto per 24h da MSSA ATCC 35556, MRSA ATCC 33591 e *S. aureus* SA1 a diversi tempi di esposizione (l'intervallo di confidenza dei baffi è del 95%).

Questi risultati hanno rivelato che PEP1 è in grado di rimuovere le cellule del biofilm entro 15 minuti, mostrando una notevole e rapida attività anti-biofilm contro i ceppi produttori di biofilm oggetto del saggio. Questi risultati sono piuttosto rilevanti, in quanto è ormai noto che gli stafilococchi hanno sviluppato diversi meccanismi molecolari di resistenza ai peptidi antimicrobici (Peschel e Sahl, 2006). Tali meccanismi, geneticamente determinati, consistono nell'alterazione della carica superficiale della membrana batterica, oltre che nella sintesi di proteasi extracellulare, esopolimeri e pompe di efflusso (Joo e Otto, 2015), e potrebbero anche contribuire alla diversa suscettibilità dei ceppi testati nei confronti del peptide. Ciò che sorprende positivamente è la velocità di azione del peptide sui biofilm esistenti emersa dalle prove sperimentali. Nello specifico, i peptidi antimicrobici finora studiati hanno mostrato la capacità di eradicare il biofilm maturo dopo tempi di esposizione decisamente più lunghi (ad esempio, 6 ore di trattamento) (Lavery et al, 2015). Il fatto che PEP1 dimostri di possedere un meccanismo d'azione molto rapido permette di ipotizzare che sia in grado di uccidere i batteri in un modo che non coinvolge necessariamente un messaggero di risposta intracellulare, poiché questa strategia richiederebbe un tempo più lungo per dare risultati.

5. Analisi al microscopio elettronico a scansione degli effetti di PEP1 su biofilm di *S. aureus*

Numerosi peptidi antibatterici uccidono i batteri prevalentemente attraverso meccanismi di permeabilizzazione della membrana cellulare, grazie alle loro proprietà anfifiliche, che li rendono in grado di inserirsi facilmente nel doppio strato lipidico della struttura (Batoni et al, 2016; Brogden,

2005). Come mostrato in Fig. 5.6, i biofilm di controllo (in assenza di peptide) erano uniformi e saldamente adesi al substrato con una rete continua, estesa e interconnessa di cellule e matrici esopolimeriche. Inoltre, i pioli di controllo sono risultati coperti da strutture multistrato e tridimensionali di cellule sessili.

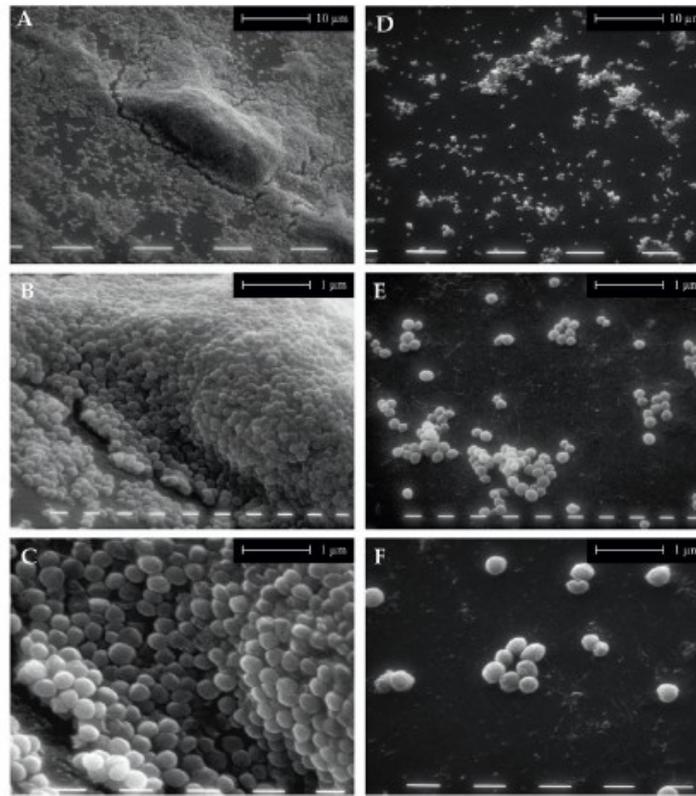


Fig. 5.6 Biofilm di *S. aureus*. Immagini SEM.

Immagini di microscopia elettronica a scansione del biofilm di *S. aureus* ATCC 35556 in assenza (A, B, C) e presenza (D, E, F) di PEP1 (80 μM). Ingrandimento: 1250x (A, D); 5000x (B, E); 10000x (C, F).

Al contrario, l'esposizione a PEP1 ha indotto un significativo danno alla membrana entro 16 ore dall'inizio dell'esposizione, e la disgregazione del biofilm era evidente per la presenza visibile di residui fluttuanti di matrice e agglomerati discontinui di cellule, oltre a piccoli aggregati cellulari che presentavano danni sulla superficie della membrana (Fig. 5.7), a riprova della sua destabilizzazione e compromissione.

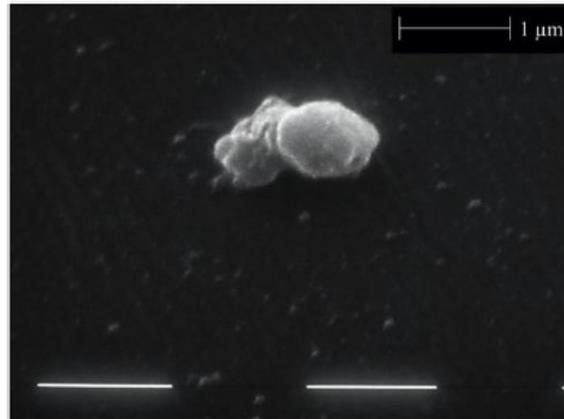


Fig. 5.7 Danno cellulare. Immagine SEM.

*Immagine di microscopia elettronica a scansione che mostra il danno a carico della membrana di *S. aureus* ATCC 35556 dopo trattamento con PEP1. Ingrandimento: 20000x.*

La modifica strutturale indotta da PEP1 ha suggerito che la modalità di azione del peptide può essere diretta alla membrana cellulare piuttosto che ai messaggeri intracellulari coinvolti nella formazione del biofilm.

FASE 3

5.3 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA E ANTIBIOFILM DI AMP PEP1 vs SALMONELLA SPP.

Questa fase sperimentale è stata svolta in collaborazione con l'Istituto LHICA dell'Università di Santiago di Compostela.

In questo studio è stata esaminata l'attività antimicrobica e anti-biofilm del peptide PEP1 contro diversi sierotipi di *Salmonella enterica*, poi associata ai profili di resistenza dei ceppi oggetti del saggio sperimentale.

5.3.1 *Materiali e Metodi*

MATERIALI

1. Selezione dei ceppi

L'attività antimicrobica del peptide PEP1 è stata studiata contro quarantaquattro diversi ceppi di *Salmonella*, appartenenti a *S. enterica* subspecie *enterica*, *S. enterica* subspecie *salamae* e *S. enterica* subspecie *arizonae*. Di questi, due ceppi di riferimento sono stati forniti dalla *Colección Española de Cultivos Tipo* (CECT) e dieci dal Laboratorio di Referenza Nazionale spagnolo (NRL) per la salmonellosi negli animali. Ventotto isolati selvatici sono stati raccolti da campioni di pesce (uno), paglia (uno) e feci animali, molti dei quali provenienti da allevamenti di polli da carne. La capacità di PEP1 di prevenire la formazione di biofilm è stata valutata contro undici di queste specie o sierotipi. I dettagli sui ceppi impiegati nello studio e sui test eseguiti sono mostrati nella Tab. 5.1

Tab. 5.1 Origine dei ceppi di *Salmonella enterica* e prove programmate.

<i>Salmonella</i> subspecies and serovar	Source	MIC	MBC	BIC
<i>S. Enteritidis</i> CECT 4300	CECT	✓	✓	✓
<i>S. Typhimurium</i> CECT 4594	CECT	✓	✓	✓
<i>S. Agama</i>	Spanish NRL for Salmonellosis in animals	✓	✓	
<i>S. Dublin</i>	Spanish NRL for Salmonellosis in animals	✓	✓	✓
<i>S. Eboko</i>	Spanish NRL for Salmonellosis in animals	✓	✓	
<i>S. Hadar</i>	Spanish NRL for Salmonellosis in animals	✓	✓	✓
<i>S. Infantis</i>	Spanish NRL for Salmonellosis in animals	✓	✓	✓
<i>S. Jerusalem</i>	Spanish NRL for Salmonellosis in animals	✓	✓	
<i>S. Meleagridis</i>	Spanish NRL for Salmonellosis in animals	✓	✓	✓
<i>S. Poona</i>	Spanish NRL for Salmonellosis in animals	✓	✓	
<i>S. Richmond</i>	Spanish NRL for Salmonellosis in animals	✓	✓	
<i>S. Virchow</i>	Spanish NRL for Salmonellosis in animals	✓	✓	✓
<i>S. Anatum</i>	Bovine faeces	✓	✓	
<i>S. Bardo</i>	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Bredeney</i>	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Dabou</i>	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Drac</i>	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Enteritidis</i>	Chicken faeces	✓	✓	✓
<i>S. Isangi</i>	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Mbandaka</i>	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Mikawasima</i>	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Montevideo</i>	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Ndolo</i>	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Newport</i>	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Seftenberg</i>	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Stanleyville</i>	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Thompson</i>	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Typhimurium</i>	Chicken faeces	✓	✓	✓
<i>S. Typhimurium</i> 1	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Typhimurium</i> 2	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Typhimurium</i> 3	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Typhimurium</i> 4	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Typhimurium</i> 5	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Typhimurium</i> 6	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Typhimurium</i> 7	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. Typhimurium</i> 8	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. arizonae</i> , serotype 48: z4, z23	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. arizonae</i> , serotype 48: z4, z23, z32	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. salamae</i> , serotype 4, 12:b-	Chicken faeces	✓	✓	
<i>S. salamae</i> , serotype 6, 8:g, m, t	Chicken faeces	✓	✓	✓
<i>S. Cerro</i>	Fish	✓	✓	
<i>S. Typhimurium monofasica</i>	Straw (cattle feed)	✓	✓	✓

I ceppi selvatici sono stati isolati da feci di bovino e pollo, pesce e paglia (lettiera) secondo ISO 6579-1: 2017 (ISO, 2017). In breve, i campioni sono stati miscelati con acqua peptonata tamponata (Merck Millipore, Germania) a $1/10$ p/v e incubati per 18 ore a 37°C. Quindi, un volume di 100 µl di campione incubato è stato inoculato su terreno semisolido modificato Rappaport-Vassiliadis (Difco Laboratories, USA) e incubato a 41°C per 48 ore per l'arricchimento selettivo. Successivamente, le piastre presunte positive per Salmonella sono state prelevate con un'ansa da inoculo sterile e piastrate su terreno selettivo XLD agar (Oxoid Ltd., Hampshire, Regno Unito) e su chromID Salmonella agar (SM-ID2, bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) a 37°C per 24 ore. Le colonie presunte di Salmonella sono state piastrate in Nutrient Agar (PanReac AppliChem, Spagna) e incubate per 24 ore a 37°C. Gli isolati sono stati confermati da un test di agglutinazione (Microgen, Londra, Regno Unito) e API 20E (bioMerieux) e quindi sierotipizzati utilizzando lo schema di tipizzazione Kauffman-White per la rilevazione di antigeni somatici (O) e flagellari (H) con antisieri standard (Bio-Rad Laboratories, California, USA).

2. Terreni e Reagenti

Il Muller-Hinton Broth (Panreac AppliChem, Spagna) e il Nutrient Agar (Panreac AppliChem, Spagna) sono stati utilizzati per la rivitalizzazione e la preparazione di inoculi batterici. La conferma di specie è stata effettuata su terreno selettivo XLD (Oxoid, Regno Unito) e CHROMID® SM2 (Biomérieux, Francia). Le diluizioni seriali sono state eseguite con soluzione salina allo 0,85% (cloruro di sodio 99,85%, Acros Organics). Il crystal violetto (Panreac AppliChem, Spagna) e il metanolo (EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph. Eur., Merck, USA) sono stati utilizzati per il BIC test (concentrazione inibente il biofilm), rispettivamente per colorare i batteri e per risolubilizzare il colorante legato alle cellule in ogni pozzetto della micropiastra.

METODI

1. Test dell'attività antibatterica

Preliminarmente, i ceppi batterici congelati a -80° C sono stati rivitalizzati in brodo di Muller-Hinton a 37°C per 24 ore e poi fatti crescere su Nutrient Agar a 37°C per altre 24 ore. Le colture per l'inoculo batterico sono state ottenute trasferendo le colonie isolate su piastra in una soluzione salina allo 0,85% fino a raggiungere una concentrazione batterica di 0,5 McFarland. Le sospensioni di coltura sono state diluite in serie fino a 10^3 UFC/ml in brodo di Muller-Hinton, concentrazione confermata mediante enumerazione in piastra, dopo aver seminato 100 µl di soluzione MH su terreno selettivo (incubazione in aerobiosi a 37°C per 24-48 ore).

La concentrazione minima inibente (MIC) è definita come la concentrazione più bassa del peptide alla quale non è stata rilevata alcuna crescita batterica. La concentrazione battericida minima (MBC) è definita come la concentrazione più bassa di peptide alla quale viene ucciso più del 99,9% delle cellule batteriche. Per valutare MIC e MBC è stato adottato il metodo descritto da Colagiorgi et al. (2020). Ciascun ceppo è stato esposto a diverse concentrazioni di PEP1. Lo stock intermedio del peptide è stato preparato giornalmente e all'occorrenza mediante sonicazione dello stock congelato, poi diluito a una concentrazione di 256 µg/ml in brodo di Muller-Hinton. Ottenuti così gli inoculi e la soluzione test di peptide, ogni pozzetto della micropiastra è stato riempito con 50 µl di sospensione batterica (1×10^3 UFC/ml) e 50 µl di concentrazione decrescente di peptide (compresa tra 256 e 0,25 µg/ml). Quindi, la micropiastra è stata incubata a 37°C per 20 ore. La crescita cellulare è stata valutata apprezzando il sedimento sul fondo dei pozzetti. Per valutare la MBC, 100 µl di sospensione sono stati prelevati dai primi tre pozzetti classificati come inibitori (tre pozzetti precedenti il primo in cui è visibile il sedimento) e seminati su Nutrient Agar, poi incubato a 37°C per 24 ore. Il saggio dell'attività antimicrobica è stato replicato almeno tre volte per tutti i ceppi.

2. Inibizione della formazione di biofilm

L'inibizione della formazione del biofilm è stata determinata in piastre per microtitolazione in polistirene a fondo piatto a 96 pozzetti utilizzando il metodo descritto da O'Toole (2011). Gli inoculi batterici e le preparazioni di stock intermedio peptidico sono state eseguite quotidianamente come descritto per il MIC test. Dopo la rivitalizzazione, le colture batteriche sono state diluite in serie fino a 5×10^8 UFC/ml e 5×10^4 UFC/ml, per dimostrare l'attività anti-biofilm del peptide contro due diverse concentrazioni di sospensione batterica. La scelta delle concentrazioni di peptide, d'altro lato, si è basata sui risultati delle MIC: sono state testate dosi subMIC di AMP PEP1 ($1/2$ e $1/4$ del valore MIC relativo), in considerazione del fatto che sono necessarie condizioni ottimali di crescita dei batteri per consentire la produzione di biofilm. Ciascun pozzetto della micropiastra a 96 pozzetti è stato riempito con 230 µl di sospensione AMP PEP1 in mezzo di crescita (brodo di Muller-Hinton) e 20 µl di coltura batterica. Le micropiastre sono state incubate per 24 ore a 37°C. Al termine dell'incubazione, il surnatante è stato allontanato dalla piastra e i pozzetti sono stati lavati tre volte con 300 µl di acqua distillata. Le cellule batteriche adese alle pareti della micropiastra sono state fissate aggiungendo 250 µl di metanolo assoluto, lasciato in posa per 15 minuti e quindi rimosso. I pozzetti sono stati quindi asciugati all'aria e i batteri rimanenti colorati con 250 µl di crystal violetto allo 0,1% per 5 minuti. I pozzetti sono stati risciacquati ponendo la micropiastra sotto l'acqua corrente. Le micropiastre sono state nuovamente essiccate all'aria prima di procedere con la risolubilizzazione del crystal violetto

legato alle cellule, distribuendo 250µl di acido acetico glaciale al 33% in ciascun pozzetto. La densità ottica (OD) dei pozzetti, infine, è stata misurata a 630 nm con un lettore di piastre. Il test anti-biofilm è stato replicato almeno tre volte per tutti i ceppi per entrambe le concentrazioni degli inoculi.

3. Profilo di resistenza antimicrobica

Sono state determinate le concentrazioni minime inibitorie (MIC) dei ceppi di Salmonella inclusi in questo studio contro 12 diversi antibiotici: ampicillina (da 1 a 128 µg/ml), cloramfenicolo (da 2 a 64 µg/ml), ciprofloxacina (da 0,06 a 8 µg/ml), gentamicina (da 0,5 a 32 µg/ml), kanamicina (da 4 a 128 µg/ml), levofloxacina (da 0,5 a 32 µg/ml), acido nalidixico (da 2 a 64 µg/ml), streptomina (da Da 4 a 256 µg/ml), sulfametossazolo (da 8 a 1.024 µg/ml), sulfisossazolo (da 8 a 1.024 µg/ml), tetraciclina (da 1 a 128 µg/ml) e trimetoprim (da 0,5 a 32 µg/ml). Gli antimicrobici standard sono stati acquistati da Sigma-Aldrich. I valori MIC sono stati determinati utilizzando il metodo della microdiluizione in brodo come descritto nelle linee guida del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020). Per ogni antibiotico è stato allestito uno stock alla concentrazione di 4096 µg/ml nel diluente descritto nelle linee guida CLSI; tale stock iniziale è stato quindi diluito in serie nel brodo di Mueller-Hinton (MH Broth, Panreac Applichem, Spagna). I ceppi di Salmonella sono stati coltivati per una notte a 37°C su Nutrient agar (Panreac Applichem, Spagna). Successivamente, le colonie isolate sono state prelevate dalle piastre e trasferite in 10 ml di soluzione salina allo 0,85% alla concentrazione finale di 0,5 McFarland. Quindi, la provetta salina è stata diluita in serie fino a una concentrazione finale di Salmonella di 10⁶ UFC/ml. Nella fase successiva, le piastre per microtitolazione a 96 pozzetti sono state riempite con 50µl di ciascuna diluizione di ciascun antibiotico e 50µl di ciascun ceppo di Salmonella. Le piastre per microtitolazione sono state incubate 24 ore a 37°C e dopo l'incubazione sono stati calcolati i valori MIC. *Escherichia coli* (ATCC 25922) ed *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) sono stati usati come ceppi di controllo e la suscettibilità o la resistenza di ciascun isolato è stata determinata in accordo con le raccomandazioni CLSI 2020. Sono stati considerati multiresistenti gli isolati di Salmonella che mostravano resistenza ad almeno tre classi di agenti antimicrobici testati.

4. Analisi statistica

Per eseguire l'analisi statistica è stata utilizzata la versione 26 del software SPSS (IBM Analytics, Armonk, NY, USA). L'analisi della varianza (modello misto lineare generalizzato) è stata utilizzata per studiare l'influenza della concentrazione di inoculo batterico sulla formazione di biofilm e gli effetti del peptide a diverse dosi sulla produzione di biofilm per ogni sierotipo.

5.3.2 *Risultati e Discussione*

1. Attività antimicrobica di PEP1 su cellule planctoniche di Salmonella enterica e profilo di resistenza.

Le prove sperimentali hanno permesso di osservare che PEP1 mostra un'attività antimicrobica molto promettente contro diversi ceppi di *Salmonella enterica*. Lianou e Koutsoumanis (2013) hanno riferito che esiste un'importante variabilità intraspecifica nella resistenza di *Salmonella* alle condizioni di stress. Per questo motivo, oltre che per ottenere risultati più rappresentativi, si è scelto di condurre il saggio su più di quaranta ceppi di *Salmonella* e trentadue diversi sierotipi. Come riportato in Tab. 5.2, è stata riscontrata un'elevata variabilità tra le subspecie di *Salmonella* e i sierotipi. Tuttavia, ogni ceppo è caratterizzato da valori di concentrazione minima inibente (MIC) molto bassi, sempre compresi tra 8 e 64 µg/ml. La concentrazione più alta di peptide è stata richiesta solo per la subspecie di *S. enterica* subsp. *salamae* 6,8: g, m, t.

Infatti, la crescita del 54% dei ceppi appartenenti alla subspecie *enteritidis* di *S. enterica* è stata inibita da una concentrazione di AMP PEP1 di 16 µg/ml (Fig. 5.8A), inclusi i sierotipi *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow* e *S. Hadar* che sono responsabili della maggior parte dei casi di infezione nell'uomo (EFSA e ECDC, 2020). Vale la pena notare che da una prima analisi degli andamenti e delle correlazioni tra i dati provenienti da ceppi di riferimento e selvatici, emerge che l'efficienza antimicrobica del peptide è maggiore contro gli stipiti ambientali, soprattutto per *S. Enteritidis*.

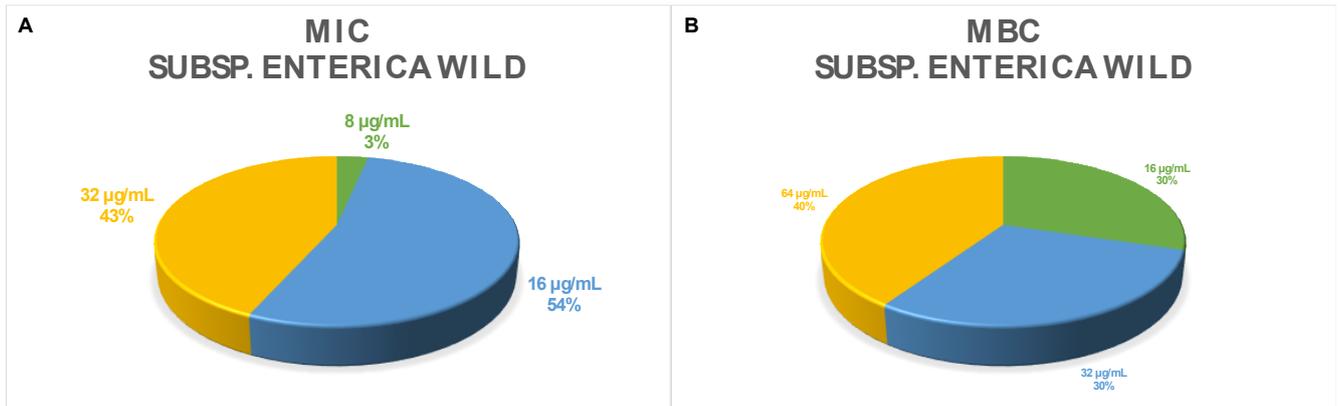


Fig. 5.8 MIC e MBC di PEP1 vs *S. enterica*. Distribuzione dei dei valori.

La distribuzione dei valori MIC (A) e MBC (B) tra i ceppi di *S. enterica subsp. enterica* è mostrata nel grafico a torta come percentuale di sierotipi suscettibili a una concentrazione nota di peptide.

La concentrazione di peptide in grado di uccidere le cellule batteriche planctoniche (MBC) differiva tra i ceppi in esame e i valori sono risultati essere uguali o superiori a quelli delle MIC corrispondenti (Tab. 5.2).

Tab. 5.2 Valori MIC e MBC di PEP1 vs *S. enterica*.

Subspecies or serovar	MIC µg/ml	MBC µg/ml	Resistant to
<i>S. Stanleyville</i>	8	32	-
<i>S. Agama</i>	16	32	-
<i>S. Anatum</i>	16	16	-
<i>S. Bredeney</i>	16	64	-
<i>S. Cerro</i>	16	16	-
<i>S. Dublin</i>	16	16	-
<i>S. Eboko</i>	16	16	-
<i>S. Enteritidis</i>	16	64	Amp
<i>S. Hadar</i>	16	32	Tet, sulf
<i>S. Infantis</i>	16	16	-
<i>S. Jerusalem</i>	16	16	Sulf
<i>S. Mbandaka</i>	16	64	-
<i>S. Mikawasima</i>	16	16	Amp
<i>S. Montevideo</i>	16	64	Sulf
<i>S. Newport</i>	16	16	Sulf
<i>S. Richmond</i>	16	16	-
<i>S. Seftenberg</i>	16	16	Strep
<i>S. Typhimurium monophasic</i>	16	16	Tet, Strep, sulf, Amp
<i>S. Typhimurium</i>	16	64	
<i>S. Typhimurium 1</i>	16	64	Tet, strep, amp
<i>S. Typhimurium 2</i>	16	64	Amp
<i>S. Typhimurium 3</i>	16	64	Amp, Strep
<i>S. Typhimurium 4</i>	16	64	Strep
<i>S. Virchow</i>	16	32	Na
<i>S. Isangi</i>	32	64	Sulf
<i>S. Meleagridis</i>	32	32	Strep, sulf, Amp
<i>S. Barro</i>	32	32	-
<i>S. Dabou</i>	32	32	-
<i>S. Drac</i>	32	32	-
<i>S. Enterica 4:b</i>	32	32	Strep
<i>S. Enteritidis CECT 4300</i>	32	64	-
<i>S. Ndolo</i>	32	32	-
<i>S. Poona</i>	32	32	-
<i>S. Thompson</i>	32	64	Amp
<i>S. Typhimurium CECT 4594</i>	32	64	-
<i>S. Typhimurium 5</i>	32	64	Strep
<i>S. Typhimurium 6</i>	32	64	-
<i>S. Typhimurium 7</i>	32	64	-
<i>S. Typhimurium 8</i>	32	64	-
<i>S. arizonae 48:z4,z23</i>	32	>128	-
<i>S. arizonae 48:z4,z23,z32</i>	32	128	-
<i>S. salamae 4, 12: b-</i>	32	64	Sulf
<i>S. salamae 4,5,12:b</i>	32	64	Sulf
<i>S. salamae 6,8: g, m, t</i>	64	64	-

Amp: ampicillina; Na: acido nalidixico; Strep: streptomycin; Sul: sulfametoxazolo; tet: tetraciclina.

Valori MIC e MBC di PEP1 contro quarantaquattro ceppi batterici. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato. I dati sono stati espressi come medie deviazioni standard (SD). I valori SD inferiori al 5% non sono stati mostrati.

La concentrazione minima battericida (MBC) variava da 16 a 128 $\mu\text{g/ml}$; su tutti, *S. arizonae* ha mostrato la massima resistenza. Ancora una volta, le specie appartenenti alla sottospecie *enterica* (Fig. 5.8B) si sono dimostrate suscettibili a basse dosi di peptide naturale: una concentrazione di 16 $\mu\text{g/ml}$ è stata sufficiente per uccidere tutte le cellule di *S. Typhimurium monofasica*. Come mostrato nella Tabella 5.2, non è stato raro il riscontro di valori di MBC sovrapponibili a quello della MIC corrispondente, come precedentemente evidenziato nella sperimentazione contro *Staphylococcus aureus*.

Parallelamente, è stato determinato anche il profilo di antibiotico-resistenza. Tre dei ceppi sono stati classificati come multi-resistenti; tra questi, *S. Typhimurium monofasica*, che mostrandosi resistente all'azione di quattro diversi gruppi di antimicrobici, è il ceppo con profilo di resistenza più elevato. D'altro lato, contro questo ceppo si sono registrati valori bassi di MIC e MBC (16 $\mu\text{g/ml}$), il che lascia supporre che il PEP1 sia efficace contro i ceppi multi-resistenti anche a basse concentrazioni. Ciò contrasta con i risultati osservati per *S. enterica* subsp. *arizonae* 48: z4, z23 e *S. enterica* subsp. *arizonae* 48: z4, z23, z32, sierotipi che causano malattia solo in soggetti altamente immunosoppressi con patologie pregresse (Lamas et al., 2018) in virtù della loro bassa virulenza. Per questi ceppi è stato riscontrato un valore MIC più elevato (rispettivamente 128 $\mu\text{g/ml}$ e >128 $\mu\text{g/ml}$) rispetto al resto dei ceppi valutati, mentre non è stata osservata alcuna resistenza agli antibiotici. Allo stesso modo, un ceppo di *S. enterica* subsp. *salamae* ha mostrato il valore MIC più alto (64 $\mu\text{g/ml}$) tra tutti i ceppi testati. Va sottolineato che per quest'ultimo ceppo è stato rilevato il valore MIC più elevato anche in un altro studio, in cui si valutava l'attività antimicrobica dell'apitossina (Lamas et al., 2020). Pertanto, è possibile che esista una relazione inversa tra il potenziale patogeno dei sierotipi e la resistenza a PEP1.

2. Valutazione dell'attività di PEP1 contro la formazione di biofilm di *S. enterica*

Considerata la capacità di *Salmonella enterica* di aderire facilmente alle superfici e alle matrici alimentari (Galie et al., 2018), è stata testata l'efficacia di AMP PEP1 sulla capacità di formazione del biofilm, importante fattore di virulenza e principale fonte di contaminazione di questi batteri (Lamas et al. 2016a). La presenza di biofilm è comune nell'industria alimentare e *S. enterica*, in assenza di umidità, può sopravvivere in biofilm su acciaio inossidabile per oltre un anno (Morita et al., 2011). L'attività inibitoria è stata valutata rispetto ai sierotipi di *Salmonella* comunemente riconosciuti come causa di focolai di tossinfezione alimentare (EFSA e ECDC, 2019), inclusi due ceppi di riferimento CECT; tra i ceppi testati, alcuni sono stati scelti proprio per la loro nota capacità di produzione di biofilm (Marin et al., 2009). Pertanto, utilizzando un metodo spettroscopico che mette in relazione la densità ottica misurata a 630 nm con la quantità di biofilm presente nel campione, sono state registrate

letture OD₆₃₀ ridotte in presenza di AMP PEP1, a riprova che il peptide aveva inibito la formazione di biofilm. I risultati hanno evidenziato che la quantità di biofilm prodotto da *S. enterica* non era omogenea tra i sierotipi e che non dipendeva dalla concentrazione dell'inoculo (Díez-García et al., 2012). In Tab. 5.3, sono riportate le correlazioni tra la formazione del biofilm e la concentrazione iniziale di cellule planctoniche per ciascun sierotipo.

Tab. 5.3 Valori di ΔOD_{630nm} di biofilm di *S. enterica*

<i>Salmonella</i> serotypes				Biofilm formation			
Genus	Species	Subsp.	Serovar	Source	Inoculum 10 ⁸ CFU/ml	Inoculum 10 ⁴ CFU/ml	<i>p</i>
					Average OD ₆₃₀ ± ES	Average OD ₆₃₀ ± ES	
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	enterica	Enteritidis 4300	CECT	0.092 ± 0.007	0.107 ± 0.007	0.008
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	enterica	Enteritidis	wild	0.083 ± 0.004	0.073 ± 0.004	0.002
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	enterica	Typhimurium 4594	CECT	0.071 ± 0.004	0.058 ± 0.004	7.47E-08
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	enterica	Typhimurium	wild	0.112 ± 0.009	0.111 ± 0.007	0.829
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	enterica	T. monofasica	wild	0.075 ± 0.006	0.074 ± 0.006	0.722
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	enterica	Infantis	NRL	0.083 ± 0.017	0.136 ± 0.02	0.001
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	enterica	Meleagridis	NRL	0.135 ± 0.019	0.11 ± 0.017	0.028
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	enterica	Virchow	NRL	0.094 ± 0.009	0.097 ± 0.008	0.574
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	enterica	Dublin	NRL	0.045 ± 0.002	0.048 ± 0.002	0.115
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	enterica	Hadar	NRL	0.047 ± 0.003	0.048 ± 0.003	0.584
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	salamae	6, 8: g, m, t	wild	0.081 ± 0.006	0.075 ± 0.005	0.169

Valori di ΔOD_{630nm} (media di quattro repliche indipendenti) di biofilm microbici prodotti da ceppi di *Salmonella enterica*. I valori sono espressi come media ± errore standard (ES). L'analisi statistica è stata effettuata solo all'interno di ciascun ceppo, confrontando i controlli di diverse concentrazioni di inoculo.

Associazioni negative sono state osservate tra i suddetti parametri per circa il 55% dei ceppi (*S. Typhimurium*, *S. Typhimurium monofasica*, *S. Virchow*, *S. Dublin*, *S. Hadar* e *S. enterica* subsp. *salamae*), per i quali le differenze nelle produzioni erano non significative. Tuttavia, gli altri cinque sierotipi (*S. Enteritidis* CECT 4300, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* CECT 4594, *S. Infantis* e *S. Meleagridis*) hanno mostrato un comportamento chiaramente diverso (Tab. 5.3). I risultati hanno infatti sottolineato che le produzioni più elevate di biofilm non erano necessariamente collegate a concentrazioni di inoculo più elevate. In letteratura, non ci sono studi che descrivano gli effetti degli inoculi sulla capacità delle salmonelle di formare biofilm.

I seguenti istogrammi (Fig. 5.9) mostrano la relazione tra la formazione di biofilm e la concentrazione di peptide a cui le cellule batteriche sono state esposte nel campione trattato. PEP1 ha ridotto la formazione di biofilm in modo diverso tra specie e sierotipi. I risultati ottenuti con l'inoculo a più alta concentrazione (Fig. 5.9A) hanno mostrato che il composto antimicrobico ha una significativa capacità

inibitoria su tutti i ceppi, ad eccezione di *S. Hadar* e *S. Virchow* rispettivamente a $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ dei valori MIC. Tra i sierotipi selvatici, il peptide sembrava essere più efficace contro *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, con una riduzione della produzione di biofilm rispettivamente del 49% e del 44%.

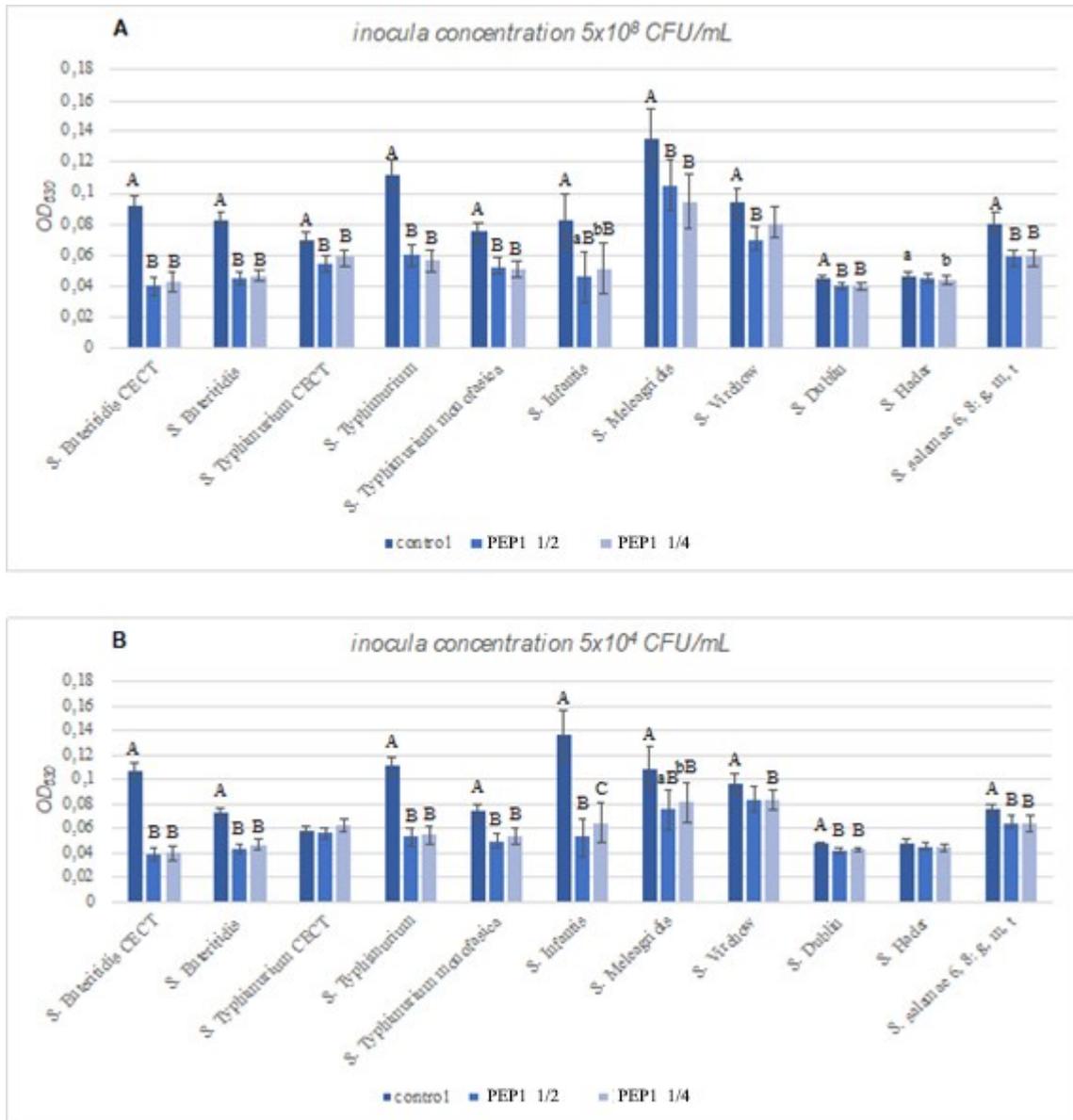


Fig. 5.9 Efficacia anti-biofilm di PEP1 vs *S. enterica*.

Effetto antibiofilm di PEP su inoculi di 108 UFC/ml (A) e 104 UFC/ml (B) di undici ceppi di *S. enterica*. Le cellule batteriche sono state incubate perché formassero il biofilm in assenza (controllo) o presenza di peptide a una concentrazione di $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ dei rispettivi valori MIC per ogni ceppo (PEP1 $\frac{1}{2}$ e PEP1 $\frac{1}{4}$, rispettivamente). L'analisi statistica è stata eseguita solo all'interno di ogni ceppo, confrontando il controllo con ogni trattato e il trattato con l'altro, a concentrazione diversa di peptide. I valori medi di OD630 sono mostrati con barre di errore che rappresentano l'errore standard di quattro repliche indipendenti. Le lettere maiuscole in apice indicano una differenza significativa all'interno di ogni ceppo a $p < 0.01$.

I test effettuati con un inoculo di 10^4 UFC/ml hanno confermato i risultati su riportati (e riferiti agli inoculi di 10^8 UFC/ml), nonostante la diversa concentrazione iniziale di cellule planctoniche (Fig. 5.9B). Tuttavia, il comportamento di *S. Typhimurium* CECT 4594 è particolarmente interessante: la concentrazione più bassa di cellule planctoniche sembra difendersi bene dall'azione del peptide. Come mostrato nella Fig. 5.9, questo sierotipo è apparso significativamente suscettibile all'azione di PEP1 quando la concentrazione dell'inoculo batterico era di 10^8 UFC/ml. Sono di certo necessari ulteriori studi per chiarire il funzionamento dell'attività anti-biofilm di PEP1, così come serve indagare più approfonditamente i complessi meccanismi di formazione del biofilm e le eventuali differenze tra i sierotipi, tenendo conto che molti fattori possono interferire nel processo (come ad esempio la fonte dell'isolato batterico) (Lamas et al., 2016b).

In entrambi i test, per ogni ceppo le differenze tra le concentrazioni di peptide non differivano in modo significativo, tranne pochi casi (Fig. 5.9). Questi dati suggeriscono che siano necessarie concentrazioni molto basse per inibire la formazione del biofilm e che l'effetto non sia dose-dipendente. Nel complesso, tutti i test hanno convalidato l'efficacia del peptide di influenzare negativamente la formazione del biofilm, evidenziando un'altra grande potenzialità di PEP1. Negli ultimi anni, diversi autori avevano ricercato nuove sostanze anti-biofilm che potessero essere proposte come alternativa a quelle comunemente in uso, ma tutte necessitavano di dosi elevate per dare l'effetto voluto (Wang et al., 2019).

I risultati sono apparsi in accordo con studi precedenti (Palmieri et al., 2018; Colagiorgi et al., 2020), che indicavano AMP PEP1 come un candidato antimicrobico ottimale per la sua grande attività contro i batteri del genere *Listeria* (cioè *L. monocytogenes*) e *Staphylococcus* (cioè *S. aureus* MRSA e *S. aureus* MSSA).

FASE 4**5.4 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DI NANOBIOCOMPLESSI PEP1-AuNPs**

Questa fase sperimentale è stata condotta in collaborazione con l'Istituto IBBR del CNR. Scopo di questo lavoro è stata la valutazione dell'attività antimicrobica di nanobiocomplessi risultanti dalla coniugazione covalente di PEP1 alla superficie di nanoparticelle ibride polimero-oro (AuNPs).

*5.4.1 Materiali e Metodi***1. Sintesi di nanosfere di Au stabilizzate con PEG**

Le nanoparticelle d'oro (AuNP) sono state sintetizzate a partire da acido cloroaurico (0,25 mM, 25 mL; HAuCl₄ · 3H₂O, Sigma-Aldrich), mescolando glicole polietilenico diacido (0,25 mM, 0,25 mL, PEG-diacido, Sigma-Aldrich) e sodio tetraidroborato (0,01 M, 20 mL, NaBH₄, Sigma-Aldrich), rispettivamente come tensioattivo e agenti riducenti (Spadavecchia et al., 2014). La formazione degli AuNP stabilizzati con PEG si è manifestata con un cambiamento istantaneo nel colore della soluzione, che ha virato dal giallo pallido al rosso brillante dopo l'aggiunta dell'agente riducente. La soluzione AuNP così preparata è stata centrifugata tre volte a 15000 rpm per 30 minuti, quindi il surnatante è stato scartato. Il pellet risultante è stato risospeso in una quantità equivalente di acqua Milli-Q.

2. Coniugazione covalente del peptide ad AuNP

I gruppi carbossilici di AuNP stabilizzati con PEG sono stati coniugati covalentemente ai gruppi N-ammina di PEP1 (0,125 o 0,030 mM) con 1-etil-3-[3-(dimetilamminopropil)] carbodiimmide cloridrato/N-idrossisuccinimmide (5 mM EDC/2,5 mM NHS, Sigma-Aldrich), sotto agitazione per una notte (ON) a temperatura ambiente, secondo lo schema riportato in Fig. 5.10 (Terracciano et al., 2015). L'aggiunta sito-specifica del gruppo carbossilico di PEG all'N-terminale del peptide è stata controllata diminuendo il pH a cui avviene la reazione. Dopo la bioconiugazione con il peptide PEP1, le NPs (PEP1-AuNPs) sono state lavate due volte con acqua Milli-Q e risospese in acqua Milli-Q.

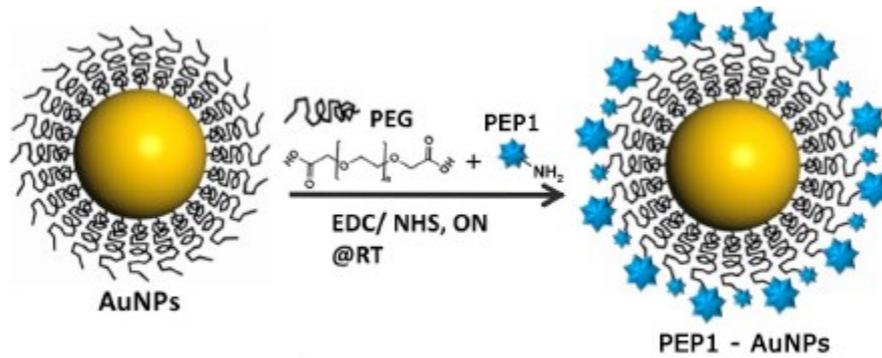


Fig. 5.10 Coniugazione di PEP1 con AuNPs

3. Caratterizzazione di AuNP nudi e modificati con PEP1

Per studiare la morfologia delle NPs prima e dopo la coniugazione con PEP1 è stata utilizzata la microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Per questo motivo, 1 ml del campione è stato centrifugato per 30 minuti a 15000 rpm e il surnatante è stato scartato. La parte solida è stata sciolta in 1 ml di acqua Milli-Q e 10 μ l della dispersione di NPs sono stati posti su una griglia di rame TEM a 400 mesh di film di carbonio Formvar, essiccata all'aria a temperatura ambiente e quindi osservata con un microscopio elettronico a trasmissione FEI Tecnai G² Spirit BT alla tensione di accelerazione di 100 kV. Il diametro idrodinamico (dimensione) e la carica superficiale (potenziale ζ) delle NPs disperse in acqua (pH 7) sono stati determinati mediante diffusione dinamica della luce utilizzando uno strumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Regno Unito) dotato di He-Ne Laser (633 nm, angolo di diffusione fisso di 173°, temperatura ambiente 25°C). 1 ml di una soluzione di NPs è stato centrifugato per 30 minuti a 15000 rpm e sciolto in acqua Milli-Q prima di ogni misurazione. Gli spettri di assorbimento di AuNPs nudi e coniugati (1 ml) sono stati registrati utilizzando uno spettrofotometro Cary 100 (Agilent) UV/VIS/NIR modello V-570 di Jasco International Co.Ltd. (Tokyo, Giappone) nell'intervallo tra 300 e 900 nm.

4. Analisi del rendimento di funzionalizzazione degli AuNP

L'analisi della resa di funzionalizzazione di AuNPs coniugati con PEP1 è stata eseguita utilizzando la cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa (RP-HPLC). Nel metodo diretto, il peptide è stato scisso dalla superficie delle NPs mediante acidolisi del legame covalente con acido trifluoroacetico (TFA) al 50% (v/v) (Sigma-Aldrich), sotto agitazione a temperatura ambiente (Merrifield, 2006) per 24 ore. Il surnatante è stato recuperato mediante centrifugazione a 15000 rpm per 30 minuti a 10°C, per rimuovere eventuali AuNPs che avrebbero potuto interferire con le

determinazioni, e quindi analizzato per quantificare la quantità di peptide legato mediante HPLC. Per le analisi, 200 µl del campione sono stati iniettati in una colonna in fase inversa *µBondapak C18* (3,9 mm × 300 mm, Waters Corp.) collegata a un sistema HPLC (Shimadzu) utilizzando un gradiente lineare dello 0,1% TFA in acetonitrile da 5 al 95%. Una soluzione di riferimento è stata preparata con la concentrazione di peptide iniziale utilizzata per la funzionalizzazione nelle stesse condizioni di reazione e analizzata in parallelo. Pertanto, conoscendo il peptide aggiunto (soluzione di riferimento), è stato possibile correlare la quantità di peptide legato (espressa in percentuale) alle nanoparticelle confrontando l'area del relativo picco. Come controllo, sono state impiegate le stesse condizioni sperimentali utilizzando il peptide libero. Nel metodo indiretto, una volta completata la funzionalizzazione, la soluzione surnatante è stata recuperata dopo centrifugazione delle nanoparticelle per rimuovere i peptidi accoppiati ed è stata calcolata l'area del picco del peptide non attaccata a AuNPs. Tutte le misurazioni sono state effettuate in triplicato.

5. Allestimento dell'inoculo batterico

Le colture di *Listeria* e *Salmonella*, oggetto del saggio, sono state conservate in congelatore a -80°C. Prima di ogni esperimento, gli stock batterici congelati sono stati piastrati rispettivamente su Half Fraser agar (Bio-Rad, Italia) e BPW agar (Biomerieux, Italia) e quindi incubati a 37°C per 16 ore, allo scopo di ottenere colonie singole per la preparazione dell'inoculo.

6. Attività antimicrobica di PEP1-AuNPs

L'efficacia antimicrobica del peptide coniugato alle nanoparticelle d'oro è stata determinata contro *L. monocytogenes* (ceppo isolato da alimenti LM₂) e *S. Typhimurium* (ATCC 13311) e ha consentito la determinazione della concentrazione minima battericida (MBC₅₀), corrispondente alla concentrazione più bassa di sostanza ad azione antimicrobica capace di causare una riduzione di almeno il 50% del numero di batteri vitali su piastra. *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* sono stati coltivati a 37°C rispettivamente in brodo Half Fraser (Bio-Rad, Italia) e BPW (Biomerieux, Italia). L'attività antibatterica di PEP1-AuNPs è stata determinata incubando 15×10⁴ UFC/ml di *Listeria* con concentrazioni crescenti di PEP1-AuNPs per 6 ore a 37°C. Ogni diluizione seriale ha previsto piastre di controllo con il solo peptide libero. In tutte le condizioni sperimentali, il metodo di conta su piastra è stato utilizzato per stimare l'attività battericida minima di PEP1-AuNPs. Nello specifico, sono state contate le colonie cresciute in piastra in presenza di diverse concentrazioni del peptide PEP1 legato alle nanoparticelle d'oro e il numero risultante è stato confrontato con quello relativo alla crescita in presenza del peptide libero, la cui MBC è stata riportata da Palmieri et al. (2018). In altre prove sperimentali, una concentrazione fissa di PEP1-AuNPs (0,16 µM) è stata incubata con colture a diversa

concentrazione di *Listeria monocytogenes* (comprese tra 15×10^2 e 15×10^5) o *S. Typhimurium* (comprese tra 15×10 e 15×10^3).

5.4.2 Risultati e Discussione

In precedenti studi (Politi et al., 2015; Politi et al., 2016), è stato dimostrato che AuNPs potrebbero essere efficacemente bioconiugate con enzimi o, più in generale, con proteine. A seguito di questa esperienza, si è deciso di coniugare covalentemente il peptide PEP1 su AuNPs. Nonostante la carica positiva piuttosto elevata della superficie e l'alta stabilità in soluzione, i nanobiocomplessi PEP1-AuNPs hanno mostrato una certa tendenza ad aggregarsi dopo l'essiccazione. Questo effetto era probabilmente dovuto al *clustering* dei peptidi che, pur funzionando bene in soluzione, spesso diventano inattivi quando legati a una superficie di supporto. Per confrontare quantitativamente l'attività biologica del peptide legato rispetto alla molecola libera, è stata determinata la resa di coniugazione di PEP1 legato alla superficie delle nanoparticelle d'oro, identificando così la quantità di peptide effettivamente presente in soluzione. Poiché la letteratura non suggeriva alcun protocollo, sono stati progettati metodi di quantificazione diretta e indiretta. In breve, dopo la coniugazione e la centrifugazione dei coniugati PEP1-AuNPs per rimuovere il peptide in eccesso, i nanobiocomplessi sono stati trattati con acido trifluoroacetico (TFA) al 50% per 24 ore a temperatura ambiente, allo scopo di idrolizzare il legame covalente tra i peptidi e la superficie delle particelle d'oro. Quindi, la quantità di peptidi legati è stata stimata direttamente mediante analisi di cromatografia liquida ad alta precisione in fase inversa (RP-HPLC), valutando l'area del picco del peptide dopo la fissazione. Conoscendo la concentrazione peptidica iniziale utilizzata per la coniugazione, è stato pertanto possibile determinare la quantità di peptide coniugata alla superficie delle nanoparticelle. I risultati della quantificazione diretta della resa della coniugazione hanno dimostrato che non più del $9,0 \pm 1,0\%$ del peptide è stato coniugato in modo covalente sulla superficie delle AuNPs. Per convalidare ulteriormente il dato, è stato quantificato anche il peptide non legato in soluzione dopo l'incubazione con AuNPs, (metodo indiretto). In questa seconda prova, una volta completata la reazione, la soluzione surnatante è stata recuperata, dopo centrifugazione delle nanoparticelle, e analizzata mediante RP-HPLC. In questa procedura, complementare all'approccio diretto, l'area del picco ha quantificato la quantità di peptide non legato alla superficie delle nanoparticelle. I dati hanno mostrato risultati simili a quelli ottenuti con il metodo di quantificazione diretta, perché il rendimento dell'accoppiamento è stato pari all' $11,0 \pm 1,0\%$. Pertanto, in media, è stato ipotizzato che circa il 10% della concentrazione di peptide iniziale

(125 μM) sia legato in modo covalente alle nanoparticelle d'oro, determinando una concentrazione di peptide di circa 12,5 μM nella soluzione.

È stata quindi valutata l'attività antimicrobica in vitro di PEP1-NPs nei confronti di due dei principali patogeni di origine alimentare, *L. monocytogenes* (Gram⁺) e *S. Typhimurium* (Gram⁻).

Poiché la virulenza e la patogenicità dei ceppi di *L. monocytogenes* possono essere notevolmente influenzate dalla sede di isolamento (es. ambienti di produzione) (Beuchat e Brackett, 1990), l'attività antimicrobica è stata testata su un ceppo isolato da campioni di pesce (LM₂), precedentemente classificato come sierotipo 4b (Palmieri et al., 2018). Sono stati eseguiti studi preliminari incubando inoculi di *Listeria* a densità cellulare crescente (circa 10², 10⁴ o 10⁵ UFC/ml) in presenza di PEP1-AuNPs a una concentrazione di 0,16 μM , calcolata sulla base della resa della coniugazione. L'esposizione alle sole nanoparticelle d'oro, cui sono state riconosciute proprietà antimicrobiche, è stata utilizzata come controllo, mentre il numero delle colonie batteriche vitali è stato misurato per valutare l'attività battericida dei nanobiocomplessi. Come mostrato in Fig. 5.11A, i nanobiocomplessi PEP1-AuNPs hanno esercitato una forte attività battericida contro il ceppo LM₂ di *L. monocytogenes*, determinando una significativa riduzione del numero di UFC rispetto a quello di AuNPs nudi. In particolare, anche AuNPs hanno dimostrato un'inibizione del 96,2% della crescita dei batteri Gram⁺, a causa del rilascio di ioni oro dal nucleo delle nanoparticelle, quando l'inoculo era pari a $1,5 \times 10^3$ UFC/ml, i nanobiocomplessi PEP1-AuNPs hanno aumentato l'efficacia antimicrobica fino al 100%.

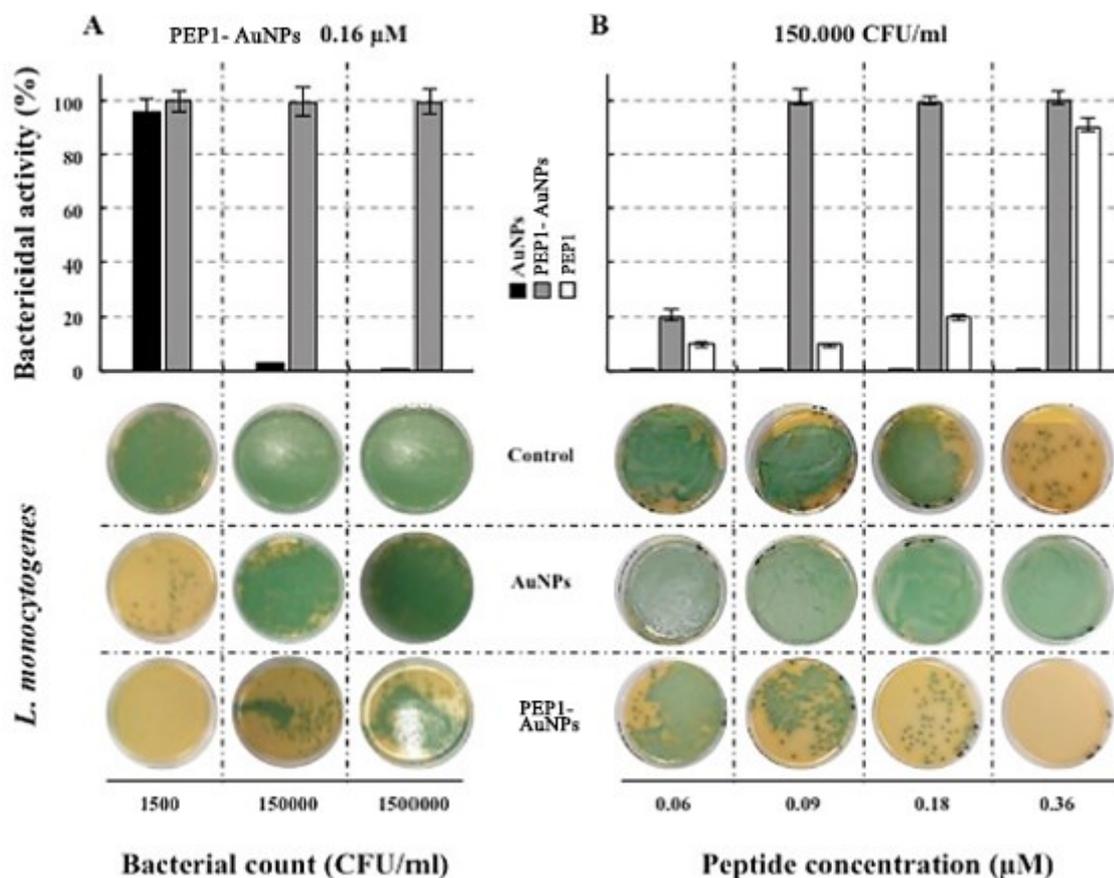


Fig. 5.11 Attività biocida di PEP1-AuNPs vs *L. monocytogenes*

- (A) Attività biocida di PEP1-AuNPs a 0,16 μM contro *L. monocytogenes* a diverse concentrazioni. I dati sono stati determinati contando le unità formanti colonie (UFC) sopravvissute all'esposizione a PEP1-AuNPs per 6 ore e sono stati espressi come attività battericida (percentuale di UFC presenti rispetto alla piastra di controllo).
- (B) Concentrazioni crescenti di PEP1-AuNPs contro una concentrazione fissa di *L. monocytogenes*. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard (SD) dalla media per un esperimento in triplicato ($n = 3$).

Molto più rilevante è stata l'inibizione della crescita batterica, fino al 99,8% e 99,9%, osservata in piastre inoculate, rispettivamente, con concentrazioni batteriche di $1,5 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^6$ dopo l'esposizione a PEP1-AuNPs, mentre le nanoparticelle d'oro non coniugate non si sono mostrate particolarmente attive. Sulla base di questi risultati, un inoculo iniziale di circa $1,5 \times 10^4$ UFC/ml, alla cui concentrazione le nanoparticelle d'oro nude non hanno mostrato alcuna attività microbica, è stato utilizzato per testare l'attività antibatterica dose-dipendente. Dopo l'esposizione dell'inoculo a concentrazioni crescenti di PEP1-AuNPs, il numero di batteri vitali è stato confrontato con quello esistente dal trattamento sia con AuNPs che con PEP1 libero (Fig. 5.11B). È stato rilevato un comportamento battericida dose-dipendente in seguito all'esposizione al peptide libero a concentrazioni comprese tra 0,10 μM e 0,58 μM (Fig. 5.11B); la concentrazione battericida minima in

grado di determinare la riduzione di almeno il 50% del numero di UFC (MBC_{50}) era di $0,58 \pm 0,03 \mu M$. Nel caso di PEP1-AuNPs, è stato riscontrato non solo un effetto dose-dipendente, ma anche un'attività battericida significativamente più alta, con valori di MBC_{50} pari a $0,14 \pm 0,01 \mu M$ (4 volte inferiori a quelli del peptide libero).

Questo risultato è di notevole rilievo, poiché i ceppi di *L. monocytogenes* isolati da prodotti alimentari o da casi di listeriosi umana hanno spesso mostrato una forte capacità di adattamento o resistenza ai comuni antibiotici e disinfettanti. Tale fenomeno, come detto, è probabilmente dovuto alla presenza di elementi genetici mobili (plasmidi) che trasportano geni di resistenza, a una permeabilità alterata della parete cellulare batterica, per modificazioni strutturali, o all'attivazione di pompe di efflusso che disintossicano la cellula (Charpentier e Courvalin, 1999; Costa et al., 2011). Inoltre, la coniugazione del peptide a nanoparticelle d'oro ha chiaramente potenziato la sua attività antimicrobica, in ragione dell'aumento della concentrazione del peptide in prossimità della membrana batterica.

Nelle successive prove sperimentali, le proprietà antibatteriche del nanobiocomplesso PEP1-AuNP sono state testate contro *S. Typhimurium*, uno tra i più pericolosi patogeni di origine alimentare, scelto come modello per i batteri Gram⁻. Sono state predisposte prove sperimentali preliminari per valutare la capacità battericida del nanocomplesso in presenza di diverse concentrazioni di batteri. Come mostrato in Fig. 5.12 solo le nanoparticelle legate al peptide hanno causato una marcata riduzione del numero di cellule batteriche vitali ($\leq 99,9\%$) di *S. Typhimurium*, quando l'inoculo di $1,5 \times 10^3$ UFC/ml è stato esposto a una concentrazione PEP1-AuNPs pari a $0,16 \mu M$. A una densità cellulare inferiore (15×10 UFC/ml), invece, anche le nanoparticelle d'oro non rivestite sono risultate attive, mostrando il 30% di attività antimicrobica.

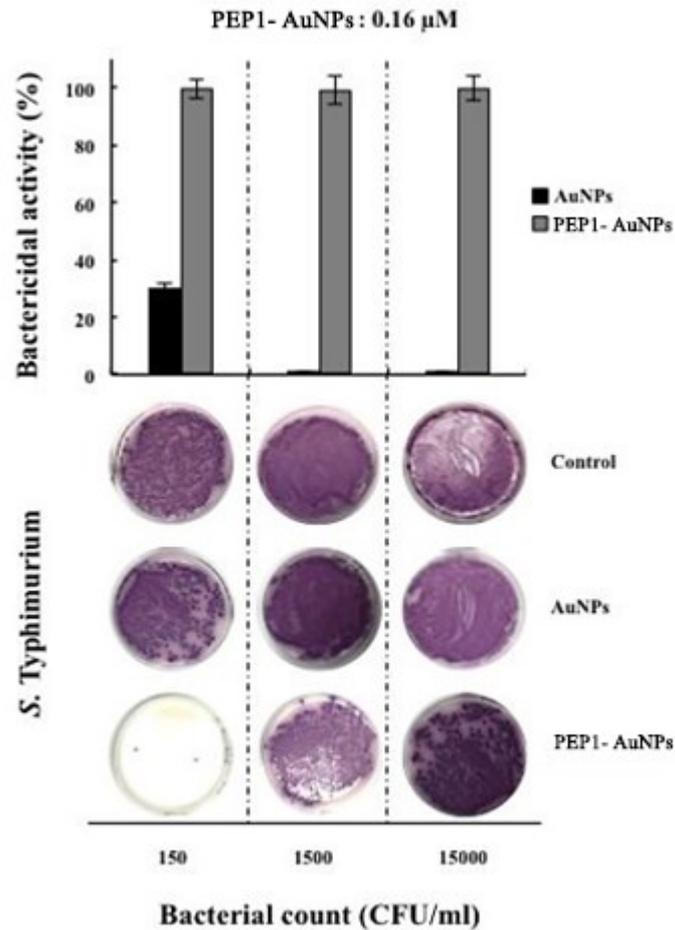


Fig. 5.12 Attività battericida di PEP1-AuNPs vs *S. Typhimurium*.

. La medesima concentrazione di nanobiocomplessi (0,16 μ M) è stata testata contro concentrazioni batteriche crescenti (UFC/ml).

Questi risultati evidenziano che AMP PEP1 coniugato alle nanoparticelle d'oro non solo ha preservato l'attività propria del peptide libero, ma addirittura ha mostrato una maggiore capacità battericida verso i batteri Gram⁻ e Gram⁺. La concentrazione degli inoculi batterici utilizzati negli esperimenti era dello stesso ordine di grandezza di quella riscontrata negli alimenti relazionabili ai focolai di salmonellosi umana, e ciò suggerisce una potenziale applicazione dei nanobiocomplessi PEP1-AuNPs nel settore dell'industria di produzione. Negli ultimi anni, molti AMPs sono stati coniugati chimicamente su svariati tipi di superfici; tuttavia, è noto che solo una frazione limitata di AMPs mantiene la sua attività dopo la coniugazione. Questo effetto dipende da diversi fattori, tra cui la composizione del peptide, la lunghezza del distanziatore peptidico, l'orientamento e la concentrazione del peptide (Costa et al., 2011). Molti studi hanno dimostrato che un AMP immobilizzato potrebbe mantenere l'attività antibatterica, ma con un'efficienza molto bassa e a una concentrazione estremamente elevata (Rai et

al., 2016). PEP1 legato alle nanoparticelle d'oro ha mostrato un'eccellente stabilità sul lungo periodo come soluzione colloidale antibatterica, dopo la conservazione (pH 7.4, temperatura ambiente, acqua deionizzata) e il riutilizzo (il complesso PEP1-AuNP è risultato stabile per almeno 7 mesi). L'elevata stabilità è dovuta principalmente a due fattori: la capacità delle nanoparticelle d'oro di mantenere attivo il peptide sulla loro superficie e la repulsione sterica tra i peptidi immobilizzati sulla superficie, che impedisce l'aggregazione e quindi la precipitazione delle nanoparticelle.

***CAPITOLO 6* CONCLUSIONI**

Il nuovo peptide derivato da IDR-1018, denominato PEP1, ha mostrato attività antimicrobica contro le cellule planctoniche e incluse nel biofilm di *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*.

I risultati ottenuti dal primo studio sperimentale hanno dimostrato che PEP1 era in grado di causare una rapida e completa eliminazione del biofilm prodotto dalle cellule batteriche di Stafilococco entro i primi 15 minuti di esposizione, nonché di prevenire completamente la formazione di biofilm, mostrando al contempo una potente attività battericida contro le cellule planctoniche. È interessante notare che l'azione antimicrobica e anti-biofilm del peptide è stata osservata non solo sui ceppi di riferimento derivanti dalla raccolta ATCC, ma anche su un ceppo selvatico isolato da alimenti (es. formaggio) con geni codificanti per diverse enterotossine stafilococciche, indicando l'efficacia e la potenziale utilità di questo peptide nel controllo dei ceppi di *S. aureus* presenti nei prodotti alimentari e negli ambienti di produzione. La velocità d'azione di PEP1 suggerisce che il meccanismo d'azione sia diretto sulla membrana cellulare e che non implichi l'interazione e l'inibizione dei messaggeri intracellulari connessi alla formazione del biofilm. Queste caratteristiche rappresentano un vantaggio per diverse applicazioni biotecnologiche, poiché gli antimicrobici che influenzano la membrana mostrano un'attività rapida e ad ampio spettro e una bassa propensione a sviluppare resistenza agli antibiotici.

I risultati ottenuti con la seconda prova sperimentale hanno mostrato che AMP PEP1 era in grado di bloccare a basse concentrazioni la moltiplicazione batterica di tutti i ceppi di *Salmonella enterica* testati e che dosi uguali o leggermente superiori alla MIC erano sufficienti per uccidere le cellule planctoniche. Interessante è la suscettibilità all'azione peptidica dimostrata da ceppi noti per la loro resistenza multipla agli antibiotici, che impegnano la comunità scientifica nella ricerca di soluzioni innovative. Per quanto riguarda la capacità anti-biofilm, il peptide si è dimostrato efficace in tal senso contro tutti i ceppi testati, compresi quelli isolati dall'ambiente e dagli alimenti.

Infine, con la terza prova sperimentale è stato dimostrato che AMP PEP1 legato a AuNPs è stato in grado di mantenere fortemente la sua attività antimicrobica piegandosi in una struttura α -elica, funzionalmente valida in presenza di un ambiente membranoso. Inoltre, le nanoparticelle d'oro hanno migliorato la capacità battericida del peptide sia contro i batteri Gram⁺ che Gram⁻. Grazie al forte legame di PEP1 alla nanoparticella d'oro e una buona copertura superficiale, il complesso antimicrobico era pienamente efficace a concentrazioni submicromolari. La concentrazione di PEP1 utilizzata nell'esperimento è risultata < 100 nM. Una concentrazione così bassa di questo piccolo peptide, bioconiugato alle AuNPs, consentirebbe la sua produzione e l'utilizzo su larga scala a costi sostenibili. Inoltre, la soluzione PEP1-AuNPs in acqua deionizzata, conservata a temperatura ambiente, è chimicamente stabile e potrebbe essere riutilizzato anche dopo 7 mesi.

In conclusione, l'attività antimicrobica e anti-biofilm, nonché l'affidabile modus operandi, la non comune stabilità a diverse condizioni di temperatura (cioè 15°C e 90°C) e di pH e la scarsa tendenza a precipitare in soluzioni acquose, rendono PEP1 un buon candidato per usi industriali, come la formulazione di biosanificanti innovativi ed ecosostenibili e l'implementazione di tecnologie di confezionamento *green*, oltre alla produzione di superfici antimicrobiche nel campo dei dispositivi medico-chirurgici.

BIBLIOGRAFIA

- Abdallah M., Benoliel C., Drider D., Dhulster P., Chihib, N.E., 2014. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch.Microbiol.* 196, 453–472.
- Adair F.W., Geftic S.G., Gelzer J., 1971. Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds. II. Cross-resistance characteristics of a mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol* 21:1058–1063.
- Alhede M., Kragh K.N., Qvortrup K. et al., 2011. Phenotypes of non-attached *Pseudomonas aeruginosa* aggregates resemble surface attached biofilm. *PLoS One*; 6: e27943.
- Alonso-Calleja C., Guerrero-Ramos E., Alonso-Hernando A., Capita R., 2015. Adaptation and cross-adaptation of *Escherichia coli* ATCC 12806 to several food-grade biocides. *Food Control* 56:86–94.
- Amer L.S., Bishop B.M., van Hoek M.L., 2010. Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against *Francisella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 246–251.
- Anwar H., Strap J.L., Chen K., Costerton J.W., 1992. Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1208–1214.
- Arvis, N. A. et al., 2016. An overview of *Salmonella* thermal destruction during food processing and preparation. *Food Control*, 68:280-290.
- Authority, E.F.S. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA Journal* 2020, 18.
- Baier R.E., 1980. Substrate influence on adhesion of microorganisms and their resultant new surface properties. In: Bitton G, Marshall KC (eds) *Adsorption of microorganisms to surfaces*. Wiley, New York, pp 59–104.
- Bailey A.M., Constantinidou C., Ivens A., Garvey M.I., Webber A., Coldham N., Hobman J.L., Wain J., Woodward M.J., Piddock L.J., 2009. Exposure of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to triclosan induces a species-specific response, including drug detoxification. *J Antimicrob Chemother* 64:973–985.
- Bals R., 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res.* 1(3):141-50.
- Batoni G., Maisetta G., Esin S., 2016. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(5), 1044–1060.

- Bendinger B., Rijnaarts H.H.M., Altendorf K., Zehnder A.J.B., 1993. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl Environ Microbiol* 59:3973–3977.
- Beuchat L.R., Brackett R.E., 1990. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature. *J. Food Sci.* 55, 755– 758.
- Beth N., Houri-haddad Y., Domb A., Khan W., Hazan R., 2015. Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015:2460122015.
- Bjorland J., Steinum T., Sunde M., Waage S., Heir E., 2003. Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 3046–3052.
- Bjorland J., Sunde M., Waage S., 2001. Plasmid-borne *smr* gene causes resistance to quaternary ammonium compounds in bovine *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 3999–4004.
- Blenkinsopp S.A., Costerton J.W., 1991. Understanding bacterial biofilms. *Trends Biotechnol* 9:138–143.
- Bloomfield S.F., 1988. Biodeterioration and disinfectants. In: Houghton, D.R., Smith, R.N., Eggins, H.O.W. (Eds.), *Biodeterioration*, 7. Elsevier Applied Science, London, pp. 135–145.
- Boehr D.D., Draker K.A., Koteva K., Bains M., Hancock R.E., Wright G.D., 2003. Broad-spectrum peptide inhibitors of aminoglycoside antibiotic resistance enzymes. *Chem. Biol.* 10, 189-196.
- Boels, G., 2011. Enzymatic removal of biofilms: a report. *Virulence* 2, 490–489.
- Bowler L.L., Zhanel G.G., Ball T.B. et al., 2012. Mature *Pseudomonas aeruginosa* biofilms prevail compared to young biofilms in the presence of ceftazidime. *Antimicrob Agents Ch*; 56:4976–9.
- Bragg R., Jansen A., Coetzee M., van der Westhuizen W., 2014. Bacterial resistance to quaternary ammonium compounds (QAC) disinfectants. *Adv. Exp. Med. Biol.* 808, 1–13.
- Bragg R.R., Meyburgh C.M., Lee J.Y., Coetzee M., 2018. Potential treatment options in a post-antibiotic era. *Infectious Diseases and Nanomedicine III*. Springer, Singapore, pp. 51–61.
- Brauner A., Fridman O., Gefen O. et al., 2016. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol* 14, 320–330.
- Brogden K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3(3):238–250.
- Brogden N.K., Brogden K.A., 2011. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, (3), 217-225.

- Brown M.R.W., Gilbert P., 1993. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *Journal of Applied Bacteriology* 74, 87S–97S.
- Bruto M., James A. et al., 2017. *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *The ISME Journal*. 11, (4), 1043-1052.
- Bryers J.D., 1984. Biofilm formation and chemostat dynamics: pure and mixed culture considerations. *Biotechnol Bioeng* 26:948–958.
- Busscher H.J., Weerkamp A., 1987. Specific and non-specific interactions: role in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiol Rev* 46:165–173.
- Butts J., 2003. Seek and destroy: Identifying and controlling *Listeria monocytogenes* growth niches. *Food Saf* 9; 2: 24.
- Campagna S.; Saint N.; Molle G.; Aumelas A., 2007. Structure and mechanism of action of the antimicrobial peptide piscidin. *Biochemistry*, 46, 1771-1778.
- Campoccia D., Montanaro L., Renata C., 2013. Biomaterials A review of the clinical implications of anti-infective biomaterials and infection-resistant surfaces. *Biomaterials* 34, 8018–8029.
- Cantoni C., D'Aubert S., Bersani C., 1984. Focolai di inquinamento microbico nella produzione e distribuzione degli alimenti carni e della pesca. In "Aspetti igienici della produzione degli alimenti. Istituto Superiore di Sanità, Rapporto ISTISAN 05/84, 35-121.
- Carpentier B., Cerf O., 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* 75:499–511.
- Casado Muñoz M.C., Benomar N., Lavilla Lerma L., Knapp C.W., Gálvez A., Abriouel H., 2016. Biocide tolerance, phenotypic and molecular response of lactic acid bacteria isolated from naturally-fermented Aloreña table to different physico-chemical stresses. *Food Microbiol* 60:1–12.
- Cerf O., Carpentier B., Sanders P., 2010. Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: “resistance” has different meanings. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 247–254.
- Ceri H., Olson M., Morck D., Storey D., Read R., Buret A., et al., 2001. The MBEC assay system: Multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. *Methods in Enzymology*, 337, 377–385.
- Chamberlain A.H.L., 1992. The role of adsorbed layers in bacterial adhesion. In: Melo LF, Bott TR, Fletcher M, Capdeville B (eds) *Biofilms-science and technology*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 59–67.
- Chapman JS, Diehl MA, Fearnside KB. 1998. Preservative tolerance and resistance. *Int J Cosmet Sci* 20:31–39.
- Characklis W.G., McFeters G.A., Marshall K.C., 1990a. Physiological ecology of biofilm systems. In: Characklis W.G., Marshall K.C. (eds) *Biofilms*. Wiley, New York, pp 341–393.

- Characklis W.G., Turakhia M.H., Zilver N., 1990b. Transfer and interfacial transport phenomena. In: Characklis W.G., Marshall K.C. (eds) *Biofilms*. Wiley, New York, pp 265–340.
- Charpentier E., Courvalin P., 1999. Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2103– 2108.
- Chitsaz M., Brown M.H., 2017. The role played by drug efflux pumps in bacterial multidrug resistance. *Essays Biochem.* 61, 127–139.
- Christensen E.G., Gram L., Kastbjerg V.G., 2011. Sublethal triclosan exposure decreases susceptibility to gentamicin and other aminoglycosides in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 4064–4071.
- Ciofu O., Tolker-Nielsen T., 2010. Antibiotic tolerance and resistance in biofilms, p 215–230. In Høiby N., Jensen P.Ø., Moser C. (ed), *Biofilm Infections*. Springer, New York.
- Cloete TE, 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *Int Biodeter Biodegrad* 51:277–282.
- CLSI (2015). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Approved standard-tenth edition. CLSI document M07-A10.
- CLSI (2020) C. M100-S25: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 30th Edition Informational Supplement.
- Codling C.E., Jones B.V., Mahenthiralingam E., Russell A.D., Maillard J.Y. 2004. Identification of genes involved in the susceptibility of *Serratia marcescens* to polyquaternium-1. *J Antimicrob Chemother* 54:370–375.
- Colagiorgi A., Bruini I., Di Ciccio P. A., Zanardi E., Ghidini S., Ianieri, A., 2017. *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry. *Pathogens* 6:e41.
- Colagiorgi A., Festa R., Di Ciccio P.A., Gogliettino M., Balestrieri M., Palmieri G., Anastasio A., Ianieri A., 2020. Rapid biofilm eradication of the antimicrobial peptide 1018-K6 against *Staphylococcus aureus*: A new potential tool to fight bacterial biofilms. *Food Control*, 107, 106815.
- Condell O., Iversen C., Cooney S., Power K.A., Walsh C., Burgess C., Fanning S., 2012. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 3087–3097.
- Connell J.H., Slatyer R.O., 1977. Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organization. *Am Nat* 111:1119–1144.
- Coronel-León J., Marqués A.M., Bastida J., Manresa, A., 2016. Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin and its application in biofilm control. *J. Appl. Microbiol.* 120, 99–111.
- Costa F., Carvalho I.F., Montelaro R.C., Gomes P., Martins M.C., 2011. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomater.* 7, 1431– 1440.

- Costerton J.W., Lappin-Scott H.M., 1989. Behaviour of bacterial biofilms. *Am Soc Microbiol News* 55:650–654.
- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M., 1995. Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49(1), 711–745.
- Coughlan L.M., Cotter P.D., Hill C., Álvarez-Ordóñez A., 2016. New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry. *Front.Microbiol.* 7:1641.
- Curiao T., Marchi E., Grandgirard D., León-Sampedro R., Viti C., Leib S.L., Baquero F., Oggioni M.R., Martinez J.L., Coque T.M., 2016. Multiple adaptive routes of *Salmonella enterica* Typhimurium to biocide and antibiotic exposure. *BMC Genomics* 17:491.
- Curiao T., Marchi E., Viti C., Oggioni M.R., Baquero F., Martinez J.L., Coque T.M., 2015. Polymorphic variation in susceptibility and metabolism of triclosan-resistant mutants of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical strains obtained after exposure to biocides and antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 59:3413–3423.
- D’Abrosca G., Paladino A., Cuoco E., Marasco R., Pacifico S., Piccolella S., Vastano V., Sacco M., Isernia C., Muscariello L., Malgieri G., 2018. Structural Characterization of the *Lactobacillus Plantarum* FlmC Protein Involved in Biofilm Formation. *Molecules.* Sep 4;23(9):2252.
- Daly B., Betts W.B., Brown A.P., O’Neill J.G., 1998. Bacterial loss from biofilms exposed to free chlorine. *Microbios* 96, 7–21.
- Das T., Sharma P.K., Busscher H.J., van der Mei H.C., Krom B.P., 2010. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(10), 3405–3408.
- Davies D., 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2:114–122.
- Davin-Regli A., Bolla J.M., James C.E., Lavigne J.P., Chevalier J., Garnotel E., Molitor A., Pagès J.M., 2008. Membrane permeability and regulation of drug “influx and efflux” in enterobacterial pathogens. *Curr Drug Targets* 9:750–759.
- Davis M., Sisco W., Jones L. et al., 2015. Recent emergence of *Escherichia coli* with cephalosporin resistance conferred by bla CTX-M on Washington State dairy farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 4403–4410.
- De Felip G., 2001. Recenti sviluppi di igiene e microbiologia degli alimenti. *Tecniche Nuove*, Milano.
- de la Fuente-Núñez C., Korolik V., Bains M., Nguyen U., Breidenstein E.B., Horsman S., Lewenza S., Burrows L., Hancock R.E.W., 2012. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2696–2704.
- de la Fuente-Núñez C., Reffuveille F., Haney E.F., Straus S.K., Hancock R.E.W., 2014. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog.* 10 (5), e1004152.

- De Smet K., Contreras R., 2005. Human Antimicrobial Peptides: Defensins, Cathelicidins and Histatins. *Biotechnol Lett* 27, 1337–1347.
- Delihias N., 2011. Impact of small repeat sequences on bacterial genome evolution. *Genome Biol. Evol.* 3, 959–973.
- Demple B., 1996. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon: a review. *Gene* 179:53–57.
- Denyer, S.P., 1995. Mechanism of action of antibacterial biocides. *International Biodeterioration* 36, 227–244.
- Díez-García M., Capita R., Alonso-Calleja C., 2012. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiol.* 31, 173–180.
- Donlan R.M., 2000. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO Journal* 46, S47–S52.
- Donlan R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* Sep;8(9):881-90.
- Drenkard E., 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* Nov;5(13):1213-9.
- Dukan S., Touati D., 1996. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J Bacteriol* 178:6145–6150.
- Dunne W.M. Jr, 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 15:155–166.
- Emslie K.R., Townsend D.E., Grubb W.B., 1985. A resistance determinant to nucleic acid-binding compounds in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* 20, 139–145.
- Epand R.M., Vogel H.J., 1999. Diversity of Antimicrobial Peptides and Their Mechanisms of Action.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1462 (1–2):11–28.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA e ECDC) The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2019: 17, e05926.
- Falcigno L., Palmieri G., Balestrieri M., Proroga Y., Facchiano A., Riccio A., Capuano F. Marrone R., Campanile G., Anastasio A., 2016. NMR and computational data of two novel antimicrobial peptides. *Data in Brief.* 8. 10.1016/j.dib.2016.06.009.
- Fan L. Sun J., Zhou M. et al., 2016. DRAMP: a comprehensive data repository of antimicrobial peptides. *Sci Rep* 6:24482.
- Fardet, A., 2016. Minimally processed foods are more satiating and less hyperglycemic than ultra-processed foods: a preliminary study with 98 ready-to-eat foods. *Food Funct.* 7, 2338–2346.
- Fawley W.N., Wilcox M.H., 2001. Molecular epidemiology of endemic *Clostridium difficile* infection. *Epidemiol Infect* 126:343–350.

- Fernández-Cuenca F., Tomás M., Caballero-Moyano F.J., Bou G., Martínez-Martínez L., Vila J., Pachón J., Cisneros J.M., Rodríguez-Baño J., Pascual Á., Spanish Group of Nosocomial Infections (GEIH) from the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) and the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI), 2015. Reduced susceptibility to biocides in *Acinetobacter baumannii*: association with resistance to antimicrobials, epidemiological behaviour, biological cost and effect on the expression of genes encoding porins and efflux pumps. *J Antimicrob Chemother* 70:3222–3229.
- Fister S., Robben C., Witte A. K., Schoder D., Wagner M., Rossmanith P., 2016. Influence of environmental factors on phage–bacteria interaction and on the efficacy and infectivity of phage P100. *Front. Microbiol.* 7:1152.
- Flemming H.C., Neu T.R., Wozniak D.J., 2007. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *J. Bacteriol.* 189(22), 7945–7947.
- Flemming H.C., Wingender J., Griegbe T., Mayer C., 2000. Physico-chemical properties of biofilms.
- Fredrickson A.G., 1977. Behaviour of mixed cultures of microorganisms. *Annu Rev Microbiol* 33:63–87.
- Frølund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen P.H., 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res.* 30(8), 1749–1758.
- Galie S., García-Gutiérrez C., Miguélez E.M., Villar C.J., Lombó F., 2018. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Frontiers in microbiology*, 9, 898.
- Galié S., García-Gutiérrez C., Miguélez E.M., Villar C.J., Lombó F., 2018. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Front Microbiol.* May 7; 9:898.
- Gandhi P.A., Sawant A.D., Wilson L.A., Ahearn D.G., 1993. Adaptation and growth of *Serratia marcescens* in contact lens disinfectant solutions containing chlorhexidine gluconate. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 183–188.
- Gharsa H., Ben S. K., Lozano C., Gómezsan E., Klibi N., Ben, S. R., et al., 2012. Prevalence, antibiotic resistance, virulence traits and genetic lineages of *Staphylococcus aureus* in healthy sheep in Tunisia. *Vet. Microbiol.* 156, 367–373.
- Gilbert P., Das J., Foley I., 1997. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 11:160–167.
- Gilbert P., Pemberton D., Wilkinson, D.E., 1990. Barrier properties of the Gram-negative cell envelope towards highmolecular weight polyhexamethylene biguanides. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 585–592.
- Gnanadhas D., Mararhe S., Chakravortty D., 2013. Biocides-resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opin. Investig. Drug* 22, 191–206.
- Gomez Escalada M., Russell A.D., Maillard J.Y., Ochs D., 2005. Triclosan- bacteria interactions: single or multiple target sites? *Lett Appl Microbiol* 41:476–481.

- Gopal N., Hill C., Ross P. R., Beresford T. P., Fenelon M. A., Cotter P. D., 2015. The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Front.Microbiol.* 6:1418.
- Gould I.M., David M.Z., Esposito S., Garau J., Lina G., Mazzei T., Peters G., 2012. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 39, 96–104.
- Gowrishankar S., Kamaladevi A., Balamurugan K., Pandian S.K., 2016. In vitro and in vivo biofilm characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from patients associated with pharyngitis infection. *BioMed Research International*, 1289157.
- Greenberg J.T., Dimple B., 1989. A global response induced in *Escherichia coli* by redox-cycling agents overlaps with that induced by peroxide stress. *J Bacteriol* 171:3933–3939.
- Grema H. A., Geidam Y. A., Gadzama G. B., Ameh J. A., Suleiman, A., 2015. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a review. *Adv. Anim. Vet.Sci.*3, 79–98.
- Griffiths P.A., Babb J.R., Bradley C.R., Fraise A.P., 1997. Glutaraldehyde-resistant *Mycobacterium chelonae* from endoscope washer disinfectors. *J Appl Microbiol* 82:519–526.
- Grøntvedt C. A., Elstrøm P., Stegger M., Skov R. L., Skytt Andersen P., Larsen K. W., et al., 2016. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in humans and pigs in Norway: a “one health” perspective on introduction and transmission. *Clin. Infect. Dis.* 63, 1431–1438.
- Gu J., Su Y., Liu P., Li P., Yang P., 2017. An environmentally benign antimicrobial coating based on a protein supramolecular assembly. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9, 198–210.
- Guerin-Mechin L., Dubois-Brissonnet F., Heyd B., Leveau J.Y., 1999. Specific variations of fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 induced by quaternary ammonium compounds and relation with resistance to bactericidal activity. *Journal of Applied Microbiology* 87, 735–742.
- Guerin-Mechin L., Dubois-Brissonnet F., Heyd B., Leveau J.Y., 2000. Quaternary ammonium compound stresses induce specific variations in fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Food Microbiology* 55, 157–159.
- Gutiérrez D., Rodríguez-Rubio L., Martínez B., Rodríguez A., García P., 2016. Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Front. Microbiol.* 7:825.
- Gutiérrez D., Ruas-Madiedo P., Martínez B., Rodríguez A., García P., 2014. Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. *PLoS One* 9:e107307.
- Haaber J., Cohn M.T., Frees D. et al., 2012. Planktonic aggregates of *Staphylococcus aureus* protect against common antibiotics. *PLoS One*; 7:e41075.
- Hamilton H.L., Domínguez N.M., Schwartz K.J., Hackett K.T., Dillard J.P., 2005. *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* 55(6), 1704–1721.

- Hancock R.E., Chapple D.S., 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* Jun; 43(6):1317-23.
- Hancock, R.E., Falla T., Brown M. H., 1995. Cationic bactericidal peptides. *Adv. Microb. Physiol.* 37:135–175.
- Harrison J.J., Turner R.J., Ceri H., 2005. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 7:981–994.
- Hassett D.J., Elkins J.G., Ma J.F., McDermott T.R., 1999. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm sensitivity to biocides: use of hydrogen peroxide as model antimicrobial agent for examining resistance mechanisms. *Methods in Enzymology* 310, 599–608.
- Hausner M., Wuertz S., 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(8), 3710–3713.
- Heath R.J., Yu Y.T., Shapiro M.A., Olson E., Rock C.O., 1998. Broad spectrum antimicrobial biocides target the FabI component of fatty acid synthesis. *J Biol Chem* 273:30316–30320.
- Hegstad K., Langsrud S., Lunestad B. et al., 2010. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microl. Drug Resist.* 16, 91–104.
- Heir E., Sundheim G., Holck A.L., 1995. Resistance to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* spp. isolated from the food industry and nucleotide sequence of the resistance plasmid pST827. *Journal of Applied Bacteriology* 79, 149–156.
- Heir E., Sundheim G., Holck A.L., 1999. Identification and characterization of quaternary ammonium compound resistant staphylococci from the food industry. *International Journal of Food Microbiology* 48, 211–219.
- Hemeg H.A., 2017. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *Int. J. Nanomed.* 12, 8211–8225.
- Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S, 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev.*; 36(4):815-36.
- Henriques AR, Gama LT, Fraqueza MJ. Tracking *Listeria monocytogenes* contamination and virulence-associated characteristics in the ready-to-eat meat-based food products industry according to the hygiene level. *Int J Food Microbiol.* 2017 Feb 2; 242:101-106.
- Henzler Wildman K.A., Dong-Kuk L., Ramamoorthy A., 2003. Mechanism of Lipid Bilayer Disruption by the Human Antimicrobial Peptide, LL-37. *Biochemistry* 42 (21), 6545-6558.
- Huang B., Deng Z., Tan M., Liao, Y., 2009. Contamination status, staphylococcal enterotoxin-producing property and drug resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from food products. *Chin. J. Health Lab. Technol.* 19, 1380–1382.

- Huang G, Mason SL, Hudson JA, Clerens S, Plowman JE, Hussain MA., 2014. Proteomic Differences between *Listeria monocytogenes* Isolates from Food and Clinical Environments. *Pathogens*. 3(4):920-933.
- Huang H., Ren H., Ding L., Geng J., Xu K., Zhang Y., 2014. Aging biofilm from a full-scale moving bed biofilm reactor: characterization and enzymatic treatment study. *Bioresour. Technol.* 154, 122–130.
- Huang K.S., Yang C.H., Huang S.L., Chen C.Y., Lu Y.Y., Lin, Y.S., 2016. Recent advances in antimicrobial polymers: a mini-review. *Int. J. Mol. Sci.* 17:e1578.
- Hugo W. B., 1967. The mode of action of antibacterial agents. *Journal of Applied Bacteriology* 30, 17–50.
- Hugo W.B., 1991. The degradation of preservatives by microorganisms. *International Biodeterioration* 27, 185–194.
- Iacumin L., Manzano M., Comi G., 2016. Phage inactivation of *Listeria monocytogenes* on San Daniele dry-cured ham and elimination of biofilms from equipment and working environments. *Microorganisms* 4:e4.
- ICMSF- International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1986. *Microorganisms in Foods, 2. Sampling for microbiological analysis principles and specific application.* University of Toronto Press.
- ICMSF, 1996. *Characteristics of Microbial Pathogens. Micro-organisms in Foods 5,* New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- In: Evans LV (ed) *Biofilms: recent advances in their study and control.* Harwood Academic, Amsterdam, pp 19–34.
- Ito A., Taniuchi A., May T. et al., 2009. Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. *Appl Environ Microb*; 75:4093–100.
- Jain R., Rivera M.C., Lake J.A., 1999. Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 30;96(7):3801-6.
- Jang H.J., Chang M.W., Toghrol F., Bentley W.E., 2008. Microarray analysis of toxicogenomic effects of triclosan on *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:695–707.
- Jiang Z., Vasil A.I., Hale J.D., Hancock R.E., Vasil M.L., Hodges R.S., 2008. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 90, 369–383.
- Johnson C.M., Grossman A.D., 2015. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): what they do and how they work. *Annu. Rev. Genet.* 49, 577–601.
- Jones I.G., Midgley M., 1985. Expression of a plasmid-borne ethidium resistance determinant from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*: evidence for a efflux system. *FEMS Microbiology Letters* 28, 355–358.

- Jones M.V., Herd T.M., Christie H.J., 1989. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides. *Microbios* 58, 49–61.
- Joo H.S., Otto M., 2015. Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1848(11 Pt B), 3055–3061.
- Kačániová M., Kluz M., Petrová J., Mellen M., Kunová S., 2015. Incidence of *Listeria monocytogenes* in meat product samples by real time PCR. *Mod Chem Appl.*, 3:2.
- Karatzas K.A., Randall L.P., Webber M., Piddock L.J., Humphrey T.J., Woodward M.J., Coldham N.G., 2008. Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 1508–1516.
- Katharios-Lanwermeier S., Rakic-Martinez M., Elhanafi D., Ratani S., Tiedje J.M., Kathariou S., 2012. Coselection of cadmium and benzalkonium chloride resistance in conjugative transfers from nonpathogenic *Listeria* spp. to other listeriae. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 7549–7556.
- Khan S., Beattie T., Knapp C. 2016. Relationship between antibiotic- and disinfectant resistance profiles in bacteria harvested from tap water. *Chemosphere* 152, 132–141.
- Kim M., Hatt J.K., Weigand M.R. et al., 2018a. Genomic and transcriptomic insights into how bacteria withstand high concentrations of benzalkonium chloride biocides. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e00197–18.
- Kim M., Weigand M.R., Oh S. et al., 2018b. Widely used benzalkonium chloride disinfectants can promote antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, 7–19.
- Kleinkauf H., von Dohren H., 1988. Peptide antibiotics, β -lactams and related compounds. *Crit. Rev. Biotechnol.* 8:1–32.
- Knapp L., Rushton L., Stapleton H., Sass A., Stewart S., Amezcua A., McClure P., Mahenthiralingam E., Maillard J.Y., 2013. The effect of cationic microbicide exposure against *Burkholderia cepacia* complex (Bcc); the use of *Burkholderia lata* strain 383 as a model bacterium. *J Appl Microbiol* 115:1117–1126.
- Koutsolioutsou A., Peña-Llopis S., Demple B., 2005. Constitutive *soxR* mutations contribute to multiple-antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 49:2746–2752.
- Kwon E.J., Skalak M., Bertucci A., Braun G., Ricci F., Ruoslahti E., Sailor M.J., Bhatia S.N., 2017. Porous Silicon Nanoparticle Delivery of Tandem Peptide Anti-Infectives for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infections. *Adv. Mater.* 29, 1701527.
- Lamas A., Arteaga V., Regal P., Vázquez B., Miranda J.M., Cepeda A., Franco C.M., 2020. Antimicrobial activity of Five Apitoxins from *Apis mellifera* on Two Common Foodborne Pathogens. *Antibiotics*, 9, 367.

- Lamas A., Fernandez-No I.C., Miranda J.M., Vázquez B., Cepeda A., Franco C.M., 2016b. Biofilm formation and morphotypes of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* differs from those of other *Salmonella enterica* subspecies in isolates from poultry houses. *J Food Prot*, 79, 1127-1134.
- Lamas A., Miranda J.M., Regal P., Vázquez B., Franco C.M., Cepeda A., 2018. A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiol Res*, 206, 60-73.
- Lamas A., Miranda J.M., Vázquez B., Cepeda A., Franco C.M., 2016a. Biofilm formation, phenotypic production of cellulose and gene expression in *Salmonella enterica* decrease under anaerobic conditions. *Int J Food Microbiol*, 238, 63-67.
- Langsrud S., Sundheim G., Brogman-Stahsen R., 2003. Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. *J. Appl. Microbiol.* 95, 874–882.
- Laureti L., Matic I., Gutierrez A., 2013. Bacterial responses and genome instability induced by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Antibiotics* 2(1), 100 –114.
- Laverty G., McCloskey A.P., Gorman S.P., Gilmore B.F., 2015. Anti-biofilm activity of ultrashort cinnamic acid peptide derivatives against medical device-related pathogens. *Journal of Peptide Science*, 21(10), 770–778.
- Li X., Robinson S.M., Gupta A., Saha K., Jiang Z., Moyano D.F., Sahar A., Riley M.A., Rotello V.M., 2014. Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug- resistant bacteria. *ACS Nano* 8, 10682– 10686.
- Lianou A., Koutsoumanis K.P., 2013. Evaluation of the strain variability of *Salmonella enterica* acid and heat resistance. *Food Microbiol*, 34, 259-267.
- Lobley A., Whitmore L., Wallace B.A., 2002. DICHROWEB: An interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics*, 18(1), 211–212.
- Lubelski J., Konings W.M., Driessen A.J., 2007. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71, 463–476.
- Lucatelli S., Peta E. A., 2008. Evoluzione nella distribuzione e nei comportamenti di consumo alimentari: la nuova domanda di tecnologie avanzate. *Agriregionieuropa* anno 4 n°14.
- Luppens S.B., Reij M.W., van der Heijden R.W., Rombouts F.M., Abee T., 2002. Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(9), 4194–4200.
- Madigan M., Martinko J., Bender K. et al., 2009. *Brock Biology of Microorganisms*, 14th edn. Pearson, USA.
- Mah T.C., O’Toole G.A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* 9, 34–39.
- Maillard J.Y., Denyer S.P., 2009. Emerging bacterial resistance following biocide exposure: should we be concerned? *Chim Oggi* 27:26–28.

- Maillard J-Y, Bloomfield S, Coelho JR, Collier P, Cookson B, Fanning S, Hill A, Hartemann P, McBain AJ, Oggioni M, Sattar S, Schweizer HP, Threlfall J., 2013. Does microbicide use in consumer products promote antimicrobial resistance? A critical review and recommendations for a cohesive approach to risk assessment. *Microb Drug Resist* 19:344–354.
- Maillard J-Y., 2007. Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern? *J Hosp Infect* 65 (Suppl 2):60–72
- Maira-Litran T., Allison D.G., Gilbert P., 2000. An evaluation of the potential of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) and the multidrug efflux pump *acrAB* to moderate resistance towards ciprofloxacin in *Escherichia coli* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 45:789–795.
- Marin C., Hernandez A., Lainez M., 2009. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poult Sci*, 88, 424-431.
- Marshall K.C., 1992. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. *Am Soc Microbiol News* 58:202–207.
- Marshall K.C., Stout R., Mitchell R., 1971. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J Gen Microbiol* 68:337–348.
- Martin D.J.H., Denyer S.P., McDonnell G., Maillard J-Y., 2008. Resistance and cross-resistance to oxidising agents of bacterial isolates from endoscope washer disinfectors. *J Hosp Infect* 69:377–383.
- Martínez-Suárez J.V., Ortiz S., López-Alonso V., 2016. Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments. *Front Microbiol* 7:638.
- Martínez-Suárez J.V., Ortiz S., López-Alonso V., 2016. Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments. *Front. Microbiol.* 7:638.
- McCay P.H., Ocampo-Sosa A.A., Fleming G.T.A., 2010. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. *Microbiology* 156:30–38.
- McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM, 2001. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol.*; 55: 77-104.
- McDonnell G., Russell A.D., 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 147–179.
- McDougald D., Rice S.A., Barraud N., Steinberg P.D., Kjelleberg S., 2011. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol.* Nov 28;10(1):39-50.
- McMurry L.M., McDermott P.F., Levy S.B., 1999. Genetic evidence that *InhA* of *Mycobacterium smegmatis* is a target for triclosan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 711–713.

- McMurry L.M., Oethinger M., Levy S.B., 1998. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* 394:531–532.
- Mechin L., Dubois-Brissonnet F., Heyd B., Leveau J.Y., 1999. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyldimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells. *Journal of Applied Microbiology* 86, 859–866.
- Meireles A., Borges A., Giaouris E., Simões M., 2016. The current knowledge on the application of anti-bio film enzymes in the food industry. *Food Res. Int.* 86, 140–146.
- Merrifield R.B., 2006. in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (Nord, F.F., Ed.) Vol. 32, Chapter 6, John Wiley & Sons, Inc., Weinheim, Germany.
- Meyer R.L., 2015. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 6:841.
- Micsonai A., Wien F., Bulyáki É., Kun J., Moussong É., Lee Y.H. et al., 2018. BeStSel: A web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Research*, 6(W1), W315–W322.
- Mika J.T., Moiset G., Cirac A.D., Feliu L., Bardají E., Planas M., Sengupta D., Marrink S.J., Poolman B., 2011. Structural basis for the enhanced activity of cyclic antimicrobial peptides: the case of BPC194. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1808, 2197– 2205.
- Mishra B., Reiling S., Zarena D., Wang G., 2017. Host Defense Antimicrobial Peptides as Antibiotics: Design and Application Strategies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 38, 87– 96.
- Mittelman M.W., 1996. Adhesion to biomaterials. In: Fletcher M (ed) *Bacterial adhesion: molecular and ecological diversity*. Wiley-Liss, New York, pp 89–127.
- Moodie R., Stuckler D., Monteiro C. et al., 2013. Profits and pandemics: prevention of harmful effects of tobacco, alcohol, and ultra-processed food and drink industries. *Lancet* 381, 670–679.
- Morales-Avila E., Ferro-Flores G., Ocampo-García B.E., López-Téllez G., López-Ortega J., Rogel-Ayala D.G., Sánchez- Padilla D., 2017. Antibacterial efficacy of gold and silver nano-particles functionalized with the ubiquicidin (29–41) antimicrobial peptide. *J. Nanomater.* 2, 10.
- Møretrø T., Schirmer B.C.T., Heir E., Fagerlund A., Hjemli P., Langsrud S., 2017. Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 241, Pages 215-224.
- Morita Y., Komoda E., Ono K., Kumagai S., 2011. Survival of biofilm-forming *Salmonella* on stainless steel bolt threads under dry conditions. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 52, 299-303.
- Mossel D.A.A., 1989: Adequate protection of the public against food-transmitted diseases of microbial aetiology. *International Journal of Food Microbiology*, 9, 271-294.
- Muhterem-Uyar M., Dalmasso M., Bolocan A.S., Hernandez M., Kapetanidou A.E., Kuchta T. et al., 2015. Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control* 51, 94–107.

- Nataro J.P., Bopp C.A., Fields P.I., Kaper J.B., Strockbine N.A., 2011. *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. Vol. 1. Washington, D.C: ASM Press; pp. 603–626.
- Nguyen U.T., Wenderska I. B., Chong M.A., Koteva K., Wright G.D., Burrows L.L., 2012. Small-molecule modulators of *Listeria monocytogenes* biofilm development. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1454–1465.
- Nickel J.C., Ruseska I., Wright J.B., Costerton J.W., 1985. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27(4), 619–624.
- Nikaido H., 1976. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. *Biochim. Biophys. Acta* 433:118-132
- Nikaido H., 1985. Role of permeability barriers in resistance to beta-lactam antibiotics. *Pharmacol. Ther.* 27:197-231.
- Nikaido H., 1989. Role of the outer membrane of Gram-negative bacteria in antimicrobial resistance, p.1-34. In L. E. Bryan (ed.), *Handbook of experimental pharmacology*, vol.91. Microbial resistance to drugs. Springer-Verlag KG, Berlin.
- Nikaido H., 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 67,593–656.
- Nikaido H., Vaara M., 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49:1-32.
- Nomura K., Ogawa M., Miyamoto H., Muratani T., Taniguchi H., 2004. Antibiotic susceptibility of glutaraldehyde-tolerant *Mycobacterium chelonae* from bronchoscope washing machines. *Am J Infect Control* 32: 185–188.
- Nortje G.L., Nel L., Jordaan E., Badenhorst K., Goedhart G., Holzapfel W.H., Grimbeek R.J., 1990. A quantitative survey of a meat production chain to determine the microbial profile of the final product. *Journal of Food Protection*, 53, 411-417.
- Nwodo U.U., Green E., Okoh A.I., 2012. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *Int. J. Mol. Sci.* 13(11), 14002–14015.
- O'Rourke E., Runyan D., O'Leary J., Stern J., 2003. Contaminated iodophor in the operating room. *Am J Infect Control* 31:255–256.
- Ochman H., Lawrence J., Groisman A., 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405, 299–306.
- Ogase H., Nagai I., Kameda K., Kume S., Ono S., 1992. Identification and quantitative analysis of degradation products of chlorhexidine with chlorhexidine-resistant bacteria with three-dimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Applied Bacteriology* 73, 71–78.

- OMS - Organisation Mondiale de la Santé, 1976: Risques microbiologiques liés aux aliments. In: "Aspects microbiologiques de l'Hygiène". Série de Rapports techniques 598, 57-75.
- Orefice L., 1984: Monitoraggio microbiologico a livello di locali, attrezzature e personale nell'industria alimentare. In: "Aspetti igienici della produzione degli alimenti. Istituto Superiore di Sanità, Rapporto ISTISAN 05/84, 135-149.
- Orefice L., Maiolatesi R., Di Virgilio A., 1988. Indagini sulla contaminazione microbica delle superfici di alcuni ambienti di produzione e di vendita degli alimenti. *Igiene e Sanità Pubblica*, 44, 267-275.
- Ortega Morente E., Fernández-Fuentes M.A., Grande Burgos M.J., Abriouel H., Pérez Pulido R., Gálvez A., 2013. Biocide tolerance in bacteria. *Int J Food Microbiol.* Mar 1;162(1):13-25.
- O'Toole G.A. 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, e2437.
- Overhage J., Campisano A., Bains M., Torfs E.C., Rehm B.H., Hancock R.E.W., 2008. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect. Immun.* 76, 4176–4182.
- Palmer A., Chait R., Kishony R., 2018. Nonoptimal gene expression creates latent potential for antibiotic resistance. *Mol. Biol. Evol.* 35, 2669–2684.
- Palmer J., Flint S., Brooks J., 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34(9), 577–588.
- Palmer R. Jr, White D.C., 1997. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends Microbiol* 5:435–440.
- Palmieri G., Balestrieri M., Capuano F., Proroga Y.T.R., Pomilio F., Centorame P., Riccio A., Marrone R., Anastasio A., 2018. Bactericidal and antibiofilm activity of batenecin-derivative peptides against the food-pathogen *Listeria monocytogenes*: New perspectives for food processing industry. *Int J Food Microbiol.* Aug 20; 279:33-42.
- Palmieri G., Balestrieri M., Proroga Y., Falcigno L., Facchiano A., Riccio A., Capuano F., Marrone R., Neglia G., Anastasio A., 2016. New antimicrobial peptides against foodborne pathogens: From in silico design to experimental evidence, *Food Chemistry*, 211, 546-554.
- Palmieri V., Bugli F., Lauriola M. C., Cacaci M., Torelli R., Ciasca G., Conti C., Sanguinetti M., Papi M., De Spirito, M., 2017. Bacteria meet graphene: modulation of graphene oxide nanosheet interaction with human pathogens for effective antimicrobial therapy. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 3 (4), 619– 627.
- Panconesi E., 1951. Note di aggiornamento sui batteriofagi (virus batterici) [Bacteriophages (bacterial virus)]. *Rass Dermatol Sifilogr.* Jan-Feb;4(1):29-40.
- Papadopoulos P., Papadopoulos T., Angelidis A. S., Boukouvala E., Zdragas A., Papa A., et al., 2018. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece. *Food Microbiol.* 69, 43–50.

- Parasion S., Kwiatek M., Gryko R., Mizak L., Malm A., 2014. Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. *Pol. J. Microbiol.* 63, 137–145.
- Parikh S.L., Xiao G., Tonge P.J., 2000. Inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, by triclosan and isoniazid. *Biochemistry* 39:7645–7650.
- Park C.B. et al., 2000. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(15):8245–8250.
- Partridge S.R., Kwong S.M., Firth N., Jensen S.O., 2018. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, 1–61.
- Patterson J.T., 1971. Microbiological assessment of surfaces. *Journal of Foods Technology*, 6, 63-72.
- Paulsen I.T., Littlejohn T.G., Radstrom P., Sundstrom L., Skold O., Swedberg G., Skurray R.A., 1993. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37, 761–768.
- Pena O.M., Afacan N., Pistollic J., Chen C., Madera L., Falsafi R., Fjell C.D., Hancock R.E.W., 2013. Synthetic cationic peptide IDR-1018 modulates human macrophage differentiation. *PLoS One* 8, e52449.
- Percival S.L., Bowler P.G., 2004. Biofilms and their potential role in wound healing. *Wounds* 16:234–240.
- Percival S.L., Thomas J., Thomas D., Williams D., 2011. Antimicrobial tolerance and role of biofilms and persister cells in wounds. *Wound Repair Regen* 19(1):1–9.
- Percival S.L., Thomas J.G., 2009. *Helicobacter pylori* prevalence and transmission and role of biofilms. *Water Health* 7(3):469–477.
- Percival S.L., Walker J., Hunter P., 2000. *Microbiological aspects of biofilms and drinking water*. CRC Press, New York.
- Perlman, D., Bodansky M., 1971. Biosynthesis of peptide antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* 40:449–464.
- Peschel A., Sahl H.G., 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4(7), 529–536.
- Pires D. P., Oliveira H., Melo L. D., Sillankorva S., Azeredo J., 2016. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2141–2151.
- Politi J., Spadavecchia J., Fiorentino G., Antonucci I., De Stefano L., 2016. Arsenate reductase from *Thermus thermophilus* conjugated to polyethylene glycol-stabilized gold nanospheres allow trace sensing and speciation of arsenic ions. *J. R. Soc., Interface* 13, 20160629.

- Politi J., Spadavecchia J., Iodice M., De Stefano L., 2015. Oligopeptide - heavy metal interaction monitoring by hybrid gold nanoparticle-based assay. *Analyst* 140, 149–155.
- Pompilio A., Scocchi M., Pomponio S., Guida F., di Primio A., Fiscarelli E., Gennaro R., Di Bonaventura G., 2011. Antibacterial and anti-biofilm effects of cathelicidin peptides against pathogens isolated from cystic fibrosis patients. *Peptides* 32, 1807–1814.
- Poole K., 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56, 20–51.
- Poole K., 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann. Med.* 39,162–176.
- Poole, K., 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 92, 55S–64S.
- Pringle J.H., Fletcher M., 1983. Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 45:811–817.
- Pu Y., Zhao Z., Li Y., Zou J., Ma Q., Zhao Y. et al., 2016. Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance in dormant bacterial Cells. *Mol. Cell* 62, 284–294.
- Pumbwe L., Randall L.P., Woodward M.J., Piddock L.J.V., 2004. Expression of the efflux pump genes *cmeB*, *cmeF* and the porin gene *porA* in multiple-antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother* 54:341–347.
- Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., O Sintim H., 2015. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents *Future Medicinal Chemistry* 7:4, 493-512.
- Radzicka A., Wolfenden R., 1988. Comparing the polarities of the amino-acids: sidechain distribution coefficients between the vapor phase, cyclohexane, 1-octanol, and neutral aqueous solution. *Biochemistry* 27 (5), 1664–1670.
- Raffaella C., Casettari L., Fagioli L., Cespi M., Bonacucin, G., Baffone W., 2017. Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 241, 132–140.
- Raheem D., 2016. Outbreaks of listeriosis associated with deli meats and cheese: an overview. *AIMS Microbiol.*; 2:230–250.
- Rai A., Pinto S., Evangelista M.B., Gil H., Kallip S., Ferreira M.G., Ferreira, L., 2016. High-density antimicrobial peptide coating with broad activity and low cytotoxicity against human cells. *Acta Biomater.* 33, 64–77.
- Rai M., Ingle A.P., Gaikwad S., Gupta I., Gade A., 2015. Nanotechnology based anti-infectives to fight microbial intrusions. *J. Appl. Microbiol.* 120, 527–542.
- Raimondo D., Andreotti G., Saint N., Amodeo P., Renzone, G., Sanseverino M., Zocchi I., Molle G., Motta A., Scaloni, A., 2005. A folding-dependent mechanism of antimicrobial peptide resistance

- to degradation unveiled by solution structure of distinctin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 6309–6314.
- Randall L.P., Bagnall M.C., Karatzas K.A., Coldham N.C., Piddock L., Woodward M.J., 2008. Fitness and dissemination of disinfectant-selected multiple-antibiotic resistant (MAR) strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61, 156–162.
- Ratani S.S., Siletzky R.M., Dutta V., Yildirim S., Osborne J.A., Lin W., Hitchins A.D., Ward T.J., Kathariou S., 2012. Heavy metal and disinfectant resistance of *Listeria monocytogenes* from foods and food processing plants. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 6938–6945.
- Reffuveille F., de la Fuente-Núñez C., Mansour S., Hancock R.E.W., 2014. A broad-spectrum anti-biofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5363–5371.
- Renner L.D., Weibel D.B., 2011. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull.* 36(5), 347–355.
- Rhoads D.D., Wolcott R.W., Cutting K.F., Percival S.L., 2007. Evidence of biofilms in wounds and potential ramifications. In: Gilbert P., Allison D., Brading M., Pratten J., Spratt D., Upton M. (eds) *Biofilms: coming of age*, vol 8. The Biofilm Club, pp. 131–143.
- Rinaudi L.V., Giordano W., 2010. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiol Lett.* Mar;304(1):1-11.
- Rittle K.H., Helmstetter C.E., Meyer A.E., Baier R.E., 1990. *Escherichia coli* retention on solid surfaces as functions of substratum surface energy and cell growth phase. *Biofouling* 2:121–130.
- Roberts M.E., Stewart P.S., 2005. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology* 151:75–80.
- Roca I., Akova M., Baquero F. et al., 2015. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect.* 6, 22–29.
- Romanova N.A., Wolffs P.F., Brovko L.Y., Griffiths M.W., 2006. Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3498–3503.
- Romão C.M.C.P.A, Faria Y.N., Pereira L.R., Asensi M.D., 2005. Susceptibility of clinical isolates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* to a hospital disinfectant and molecular typing. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:541–548
- Roy R., Tiwari M., Donelli G., Tiwari V., 2018. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence.* Jan 1;9(1):522-554.
- Russell A.D., Gould G.W., 1988. Resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and disinfectants. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 65, 167S–195S.

- Russell A.D., 1991. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology* 71, 191–201.
- Russell A.D., 1997. Plasmids and bacterial resistance to biocides. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 83, 155–165.
- Russell A.D., Chopra I., 1990. *Understanding Antibacterial Action and Resistance*, second ed. Ellis Horwood, Chichester, UK.
- Russell, A.D., Maillard, J.-Y., 2000. Response. *American Journal of Infection Control* 28, 204–206.
- San Millan A., 2018. Evolution of plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context. *Trends in Microbiology*. 26, (12), 978-985.
- Sánchez M.B., Decorosi F., Viti C., Oggioni M.R., Martínez J.L., Hernández A., 2015. Predictive studies suggest that the risk for the selection of antibiotic resistance by biocides is likely low in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS One* 10: e0132816.
- Sasatsu M., Shimizu K., Noguchi N., Kono M., 1993. Triclosan-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 341:756.
- Sasatsu M., Shirai Y., Hase M., Noguchi N., Kono M., Behr H., Freney J., Arai T., 1995. The origin of the antiseptic-resistance gene *ebr* in *Staphylococcus aureus*. *Microbios* 84, 161–169.
- Sauer P., Síla J., Stosová T., Vecerová R., Hejnar P., Vágnerová I., et al., 2008. Prevalence of genes encoding extracellular virulence factors among meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the University Hospital, Olomouc, Czech Republic. *J. Med. Microbiol.* 57, 403–410.
- Saye D.E., 2007. Recurring and antimicrobial-resistant infections: considering the potential role of biofilms in clinical practice. *Ostomy Wound Care Manage* 53:46–48.
- Schweizer H.P., 2001. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters* 202, 1–7.
- Seshadri Sundararajan V., Gabere M.N., Pretorius A., Adam S., Christoffels A., Lehväslaiho M., Archer J.A., Bajic V.B., 2012. DAMPD: a manually curated antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Res* 40 (Database issue): D1108–D1112.
- Shen Y., Köller T., Kreikemeyer B., Nelson D.C., 2013. Rapid degradation of *Streptococcus pyogenes* biofilms by PlyC, a bacteriophage-encoded endolysin. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1818–1824.
- Sidhu M.S., Heir E., Leegaard T., Wiger K., Holck A., 2002. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with β -lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 2797–2803.
- Sidhu M.S., Heir E., Sorum H., Holck A., 2001. Genetic linkage between resistance to quaternary ammonium compounds and β -lactam antibiotics in food-related *Staphylococcus* spp. *Microbial Drug Resistance* 7, 363–371.

- Solano C., Echeverez M., Lasa I., 2014. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol.* Apr; 18:96-104.
- Solberg M., Buckaiew J.L, Chen C.M., Schaffner D.W., O'Neill K., McDonell J., Post L.S., Boderk M, 1990. Microbiological safety assurance systems for foodservice facilities. *Food Technology*, 12, 68-73.
- Spadavecchia J., Perumal R., Barras A., Lyskawa J., Woisel P., Laure W., Pradier C. M., Boukherroub R., Szunerits S., 2014. Amplified plasmonic detection of DNA hybridization using doxorubicin-capped gold particles. *Analyst* 139, 157– 164.
- Sreerama N., Woody R.W., 2000. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry*, 287(2), 252–260.
- Srey S., Jahid I.K., Ha S., 2013. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control* 31, 572–585.
- Stepanovic S., Vukovic D., Hola V., Di Bonaventura G., Djukic S., Cirkovic I., et al., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 115(8), 891–899.
- Stewart P.S., 2015. Antimicrobial tolerance in biofilms. *Microbiol Spectr*; 3.
- Stewart, P., Franklin, M., 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 6, 199–210.
- Sundheim G., Hagtvedt T., Dainty R., 1992. Resistance of meat associated staphylococci to a quaternary ammonium compound. *Food Microbiology* 9, 161–167.
- Sutherland I.W., 2001. The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9:222–227.
- Sveum W.H., Moberg L.J., Rude R.A., Frank J.F., 1992: Microbiological monitoring of the foods processing environment. In: "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods". American Public Health Association Washington.
- Swartjes J.J.T.M., Veeregowda D.H., 2016. Implications for directionality of nanoscale forces in bacterial attachment. *Biophys. Rep.* 1, 120–126.
- Tattawasart U., Maillard J.-Y., Furr J.R., Russell A.D., 1999. Comparative response of *Pseudomonas stutzeri* to antibacterial agents. *Journal of Applied Microbiology* 87, 323–331.
- Tattawasart U., Maillard J.Y., Furr J.R., Russell A.D., 2000. Outer membrane changes in *Pseudomonas stutzeri* resistant to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride. *Int J Antimicrob Agents* 16:233–238.
- Templeton M., Oddy F., Leung W., Rogers M., 2009. Chlorine and UV disinfection of ampicillin-resistant and trimetoprim-resistant *Escherichia coli*. *Can. J. Civ. Eng.* 889–894.

- Terracciano M., Shahbazi M.A., Correia A., Rea I., Lamberti A., De Stefano L., Santos H.A., 2015. Surface bioengineering of diatomite based nanovectors for efficient intracellular uptake and drug delivery. *Nanoscale* 7, 20063–20074.
- Thévenot D., Dernburg A., Vernozy-Rozand C., 2006. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *J. Appl. Microbiol.* 101,7–17.
- Thomas L., Russell A.D., Maillard J.Y., 2005. Antimicrobial activity of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa* and its response to biocide residues. *J Appl Microbiol* 98:533–543.
- Thorold C.A., Letsoalo M.E., Dusé A.G., Marais E., 2007. Efflux pump activity in fluoroquinolone and tetracycline resistant *Salmonella* and *E. coli* implicated in reduced susceptibility to household antimicrobial cleaning agents. *International Journal of Food Microbiology* 113, 315 - 320.
- Tolker-Nielsen T., 2015. Biofilm Development. *Microbiol Spectrum*3 (2): MB-0001-2014.
- Torres C.E., Lenon G., Craperi D., Wilting R., Blanco, A., 2011. Enzymatic treatment for preventing biofilm formation in the paper industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 95–103.
- Valsangiacomo C., Dolina M., Peduzzi R., Jäggl M., 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients and dairy food (fresh cheese): a survey over a decade in southern Switzerland. *Clin. Microbiol. Infect.*6, 393–394.
- van Stokkum I.H.M., Spoelder H.J.W., Bloemendal M., van Grondelle R., Groen F.C.A., 1990. Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Analytical Biochemistry*, 191(1), 110–118.
- Vandecraen J., Chandler M., Aertsen A., Van Houdt R., 2017. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Crit. Rev. Microbiol.* 43, 709–730.
- Venkatesan N., Perumal G., Doble M., 2015. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria Nandakumar *Future Microbiology* 10:11, 1743-1750.
- Villa F., Cappitelli F., 2013. Plant-derived bioactive compounds at sub-lethal concentrations: towards smart biocide-free antibiofilm strategies *Phytochem Rev.*12:245–254.
- Volpe G., Delibato E., Orefice L., Palleschi G., 2005. Tossinfezioni alimentari e metodiche recenti ed innovative per la ricerca dei batteri patogeni responsabili. *Caleidoscopio Italiano*; 20-22.
- Waghu F.H., Barai R.S., Gurung P., Idicula-Thomas S., 2016. CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res* 44 (D1): D1094–D1097.
- Wang G., Li X., Wang Z., 2016. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res* 44(D1): D1087–D1093.
- Wang H., Wang H., Xing T., Wu N., Xu X., Zhou G., 2016. Removal of *Salmonella* biofilm formed under meat processing environment by surfactant in combination with bio-enzyme. *LWT Food Sci. Technol.* 66, 298–304.

- Wang H.L., Ghanem K.G., Wang P., Yang S. & Li T.S. 2013. Listeriosis at a tertiary care hospital in Beijing, China: high prevalence of non-clustered healthcare-associated cases among adult patients. *Clin Infect Dis*, 56, 666–676.
- Wang L., Zhao X., Xia X., Zhu C., Qin W., Xu Y., Hang B., Sun Y., Chen S., Zhang H., 2019. Antimicrobial Peptide JH-3 Effectively Kills *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strain CVCC541 and Reduces Its Pathogenicity in Mice. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11, 1379-1390.
- Wang R., Bono J.L., Kalchayanand N., Shackelford S., Harhay D.M., 2012. Biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains and their tolerance to sanitizers commonly used in the food processing environment. *Journal of Food Protection* 75, 1418–1428.
- Wassenaar T., Ussery D., Nielsen L., Ingmer H., 2015. Review and phylogenetic analysis of *qac* genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* species. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 5, 44–61.
- Waters C.M., Bassler B.L., 2005. Quorum sensing: comunicazione cellula-cellula nei batteri. *Ann Rev Cell Develop Biol.* 21: 319–346.
- Webber M.A., Coldham N.G., Woodward M.J., Piddock L.J.V., 2008. Proteomic analysis of triclosan resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother* 62:92–97.
- Webber M.A., Whitehead R.N., Mount M., Loman N.J., Pallen M.J., Piddock L.J.V., 2015. Parallel evolutionary pathways to antibiotic resistance selected by biocide exposure. *J Antimicrob Chemother* 70:2241–2248.
- Wesgate R., Grasha P., Maillard J.Y., 2016. Use of a predictive protocol to measure the antimicrobial resistance risks associated with biocidal product usage. *Am J Infect Control* 44:458–464.
- Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S., 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295(5559), 1487.
- White D.G., Goldman J.D., Demple B., Levy S.B., 1997. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 179, 6122–6126.
- Whitmore L., Wallace B.A., 2004. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research*, W32, W668–W673.
- Whitmore L., Wallace B.A., 2008. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers*, 89(5), 392–400.
- Wieczorek M., Jensen H., Kindrachuk J., Scott W.R.P., Elliott M., Hilpert K., Cheng J.T.J., Hancock R.E.W., Straus S.K., 2010. Structural studies of a peptide with immune modulating and direct antimicrobial activity. *Chem. Biol.* 17, 970–980.

- Winder C.L., Al-Adham I.S., Abdel Malek S.M., Buultjens T.E., Horrocks A.J., Collier P.J., 2000. Outer membrane protein shifts in biocide-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Appl Microbiol* 89:289–295.
- Wu X., Wang Y., Tao L., 2011. Sulfhydryl compounds reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation by inhibiting PIA biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 316, 44–50.
- Zaslhoff M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395.
- Zelezetsky I., Tossi A., 2006. Alpha-helical antimicrobial peptides - using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1436–1449.
- Zhang D., Li H., Lin X., Wang S., Peng X., 2010. Characterisation of outer membrane proteins of *Escherichia coli* in response to phenol stress. *Current Microbiology* 62, 777–783.
- Zhang Q.X., Zhang Y., Shan H.H., Tong Y.H., Chen X.J., Liu F.Q., 2017. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* W10. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 25000–25009.
- Zhang X., Bishop P.L., 2003. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere* 50(1), 63–69.
- Zhao H., Shao D., Jiang C., Shi J., Li Q., Huang Q. et al., 2017. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 5951–5960.
- Zhou Q., Tang M., Zhang J. et al., 2017. Is the potential Interconnection between antibiotic susceptibility and disinfectant resistance a threat to food safety? *Agric. Sci. Technol.* 18, 1033–1037.

SITOGRAFIA

Focus IRi, Il mercato della Carne. Disponibile su

<https://www.cibus.it/wp-content/uploads/2020/06/CIBUS-FOCUS-5-MEAT.pdf>

ISS (Istituto Superiore di Sanità). EpiCentro, il portale epidemiologico per la sanità pubblica. Campylobacter. Disponibile su:

<http://www.epicentro.iss.it/problemi/campylobacter/campylobacter.asp>

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie 184 -rev 01 -Linee guida per il campionamento di superfici per analisi microbiologica_on-line, 04/19. Disponibile su:

<https://www.izsvenezie.it/documenti/servizi/servizi-diagnostici/campionamento-superfici-per-analisi-microbiologiche.pdf>

O'Neill J., 2015. The Review on Antimicrobial Resistance. Disponibile su <http://amr-review.org/> (accessed March 22, 2018).

RASFF 2019. Relazione annuale. Disponibile su:

http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2914_allegato.pdf.

FONTI NORMATIVE

FONTI COMUNITARIE

- Regolamento CE 178/02
- Regolamento CE 852/04
- Regolamento CE 853/2004
- Regolamento CE 1169/2011
- Regolamento CE 2073/05

FONTI NAZIONALI

- DM 7 luglio 1997, n. 274
- Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 30.7.2016

La borsa di dottorato è stata cofinanziata con risorse del
Programma Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CCI 2014IT16M2OP005),
Fondo Sociale Europeo, Azione I.1 "Dottorati Innovativi con caratterizzazione Industriale"



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



*Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della Ricerca*

