IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

RC 2008 - Studio della contaminazione ambientale da *Listeria monocytogenes* e distribuzione della contaminazione su formaggi erborinati

Vincenza Prencipe
Reparto di Igiene delle tecnologie alimentari e dell'alimentazione animale
LNR per *Listeria monocytogenes*

Indice

a) Premessa

b) Obiettivi

c) Attività svolte e Risultati

d) Conclusioni

Premessa

a) *Listeria monocytogenes* rappresenta la quinta causa di zoonosi e negli ultimi anni in EU si è registrato un incremento del numero dei casi nell'uomo.

b) Microrganismo ubiquitario, in grado di resistere a condizioni ambientali sfavorevoli, *L. monocytogenes* rappresenta un grave rischio se presente in prodotti pronti per il consumo. Negli anni 1999-2001, circa metà dei focolai e dei casi sporadici di listeriosi nell'uomo sono stati associati al consumo di formaggi.

Premessa

a) In uno studio realizzato dall'IZSAM nel 2007, *L. monocytogenes* è stata isolata nel 4,5% dei campioni di gorgonzola e nel 5,9% di taleggio, con livelli di contaminazione fino a 460 MPN/g in alcuni campioni di taleggio.

b) L'origine della contaminazione è principalmente ambientale e i meccanismi con cui si diffonde sono specifici per ogni stabilimento. Pertanto, individuarne le fonti e il loro contributo nella contaminazione del prodotto finito, è prioritario per definire qualsiasi efficace misura di controllo.

Obiettivo

a) Con il progetto di Ricerca Corrente 2008 si è inteso studiare le dinamiche di contaminazione degli ambienti di lavorazione e del prodotto finito prendendo come modello il processo produttivo del gorgonzola e del taleggio, due tra i formaggi più frequentemente contaminati da *L. monocytogenes*

Attività svolte e Risultati

a) Selezione degli stabilimenti e analisi dei processi

b) Campionamenti ambientali e di prodotto

c) Analisi dei ceppi di *L. monocytogenes*

Selezione degli stabilimenti

a) In due diversi caseifici del Consorzio per la tutela del formaggio Gorgonzola sono state eseguite quattro sessioni di campionamento distribuite nell'arco di un anno prelevando tamponi ambientali nelle principali aree di lavorazione.

b) Gli stabilimenti sono stati individuati sulla base delle strutture e delle quantità produttive.

Campionamenti ambientali e di prodotto

a) 4 sessioni di campionamento distribuite nell'arco di un anno prelevando tamponi ambientali nelle principali aree di lavorazione:

b) caseificazione
c) salatura
d) stagionatura
e) taglio e confezionamento

f) All'interno di ciascuna area sono state campionate superfici a contatto (utensili e macchinari) e non a contatto (canaline di scarico del siero e tombini)

Campionamenti ambientali e di prodotto

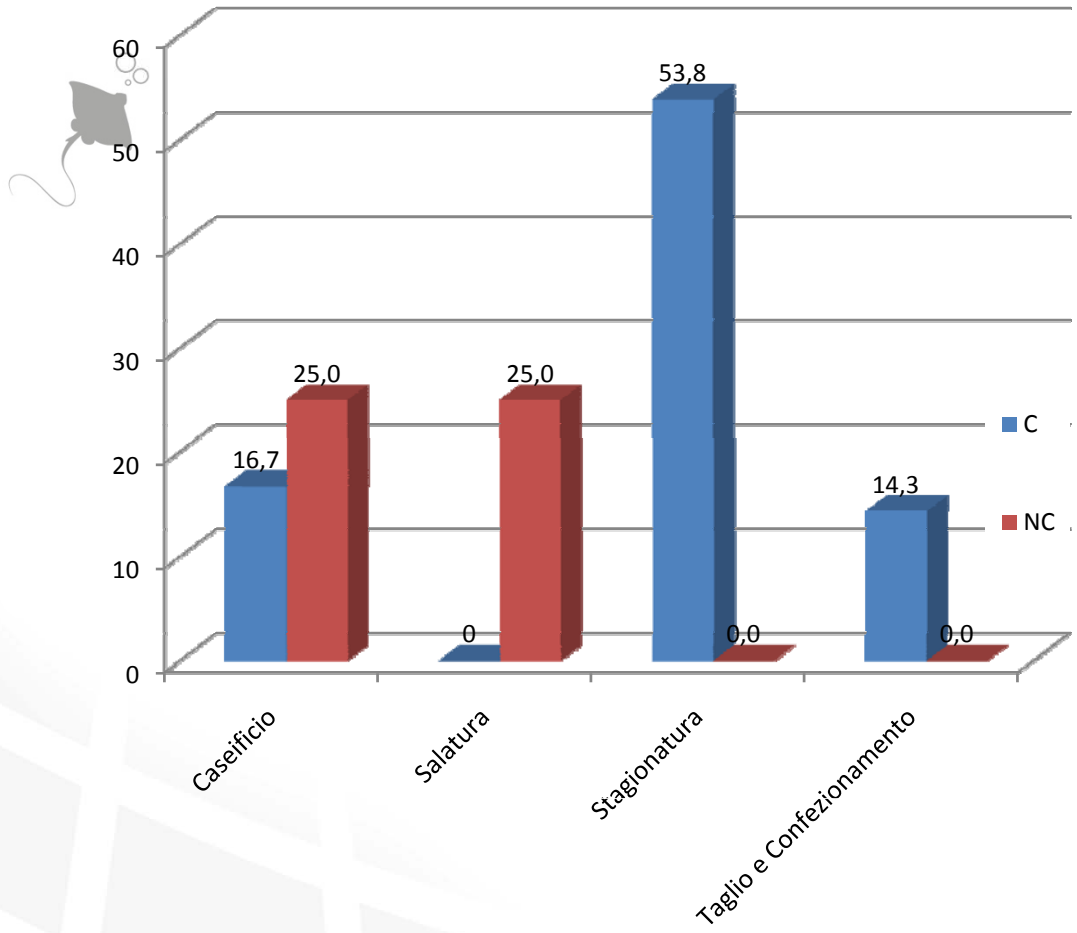
PUNTI DI PRELIEVO

- ✓ 19-27 superfici (a contatto e non a contatto con il prodotto)
- ✓ campioni di acqua di scarico

MODALITA' di CAMPIONAMENTO

- ✓ spugnette

Campionamenti ambientali e di prodotto

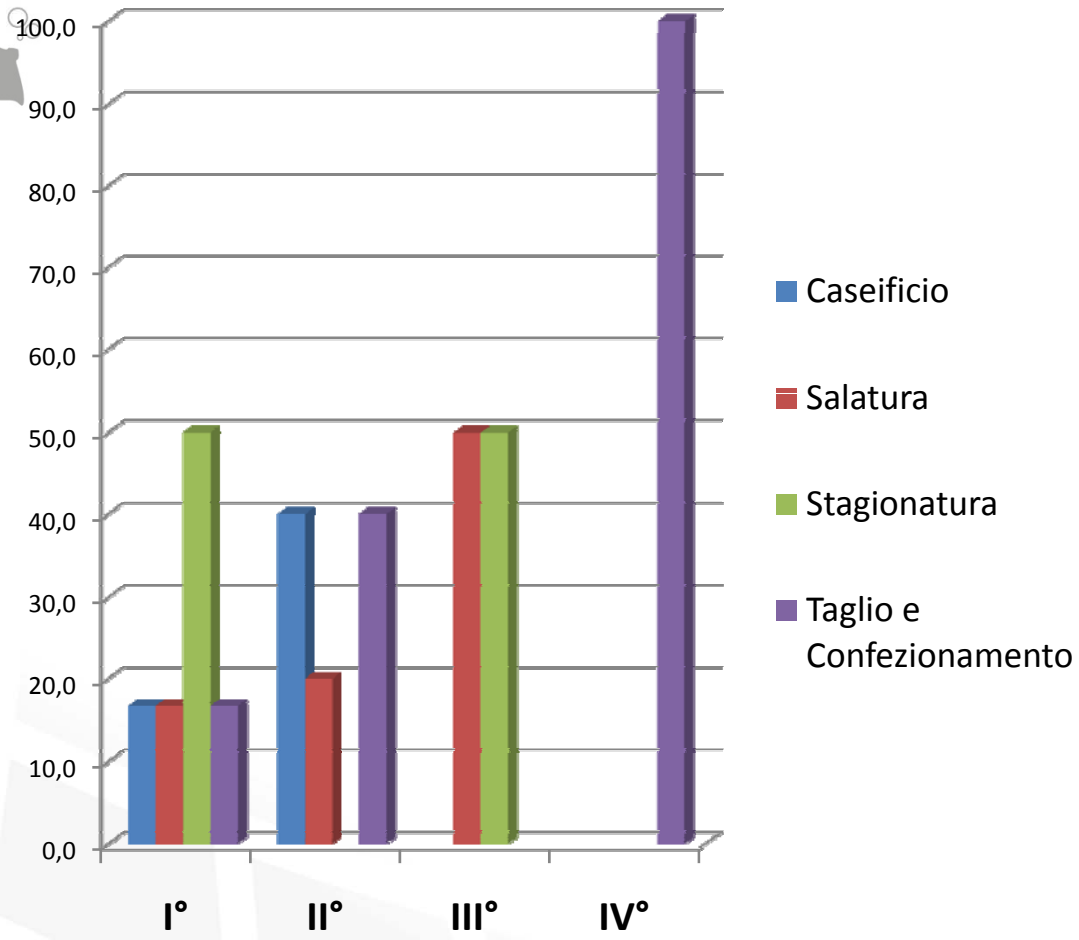


a) Sono stati analizzati 80 campioni ambientali di cui 58 superfici a **contatto** e 22 **non a contatto**.

b) Il 20% delle superficie a **contatto** e il 18% delle **non a contatto** sono risultate contaminate da *Listeria monocytogenes*

a) ***Listeria* spp.** è stata rilevata in 13 campioni ambientali (16 %)

Campionamenti ambientali e di prodotto



Stabilimento 1

a) **I° prelievo**: 6 campioni positivi (7,5%)

b) **II° prelievo** 5 campioni positivi (6,3%)

c) **III° prelievo** 2 campioni positivi (2,5%)

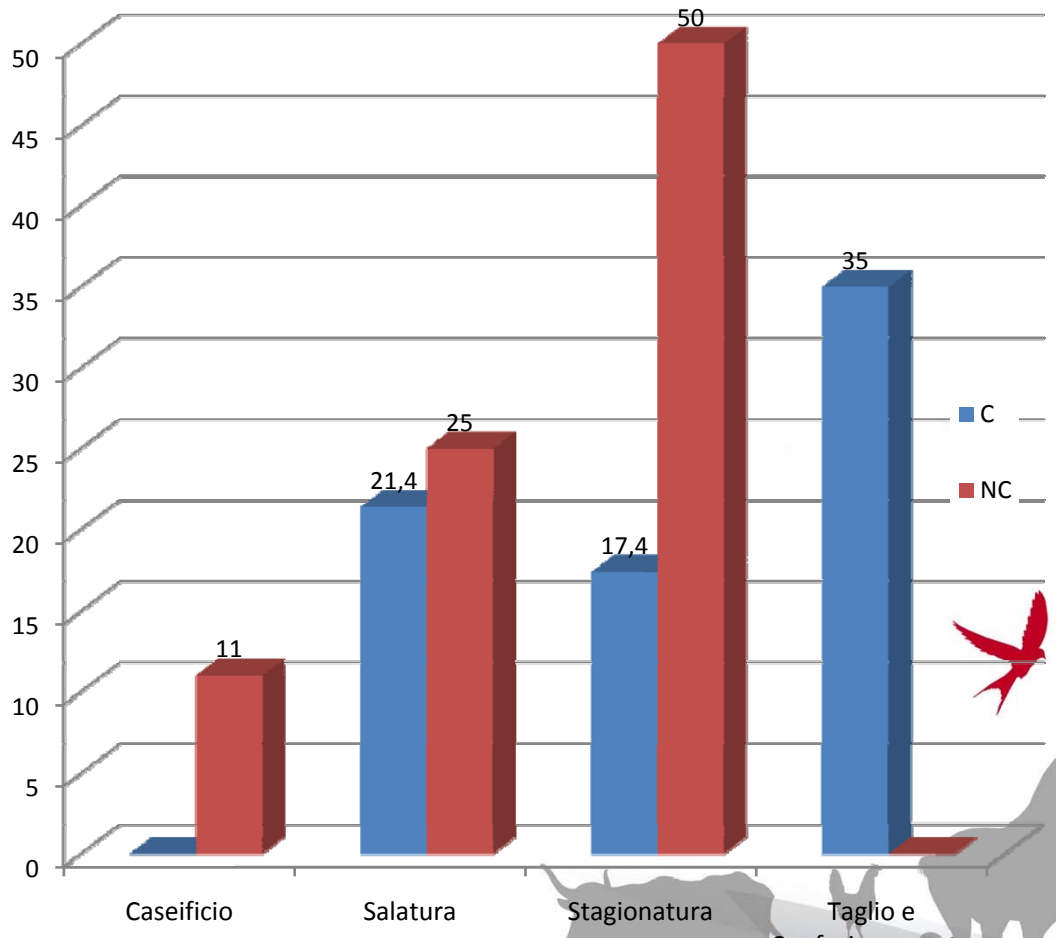
d) **IV° prelievo** 3 campioni positivi (3,8%)

Campionamenti ambientali e di prodotto

a) Sono stati analizzati 89 campioni ambientali di cui 68 superfici a contatto e 21 non a contatto.

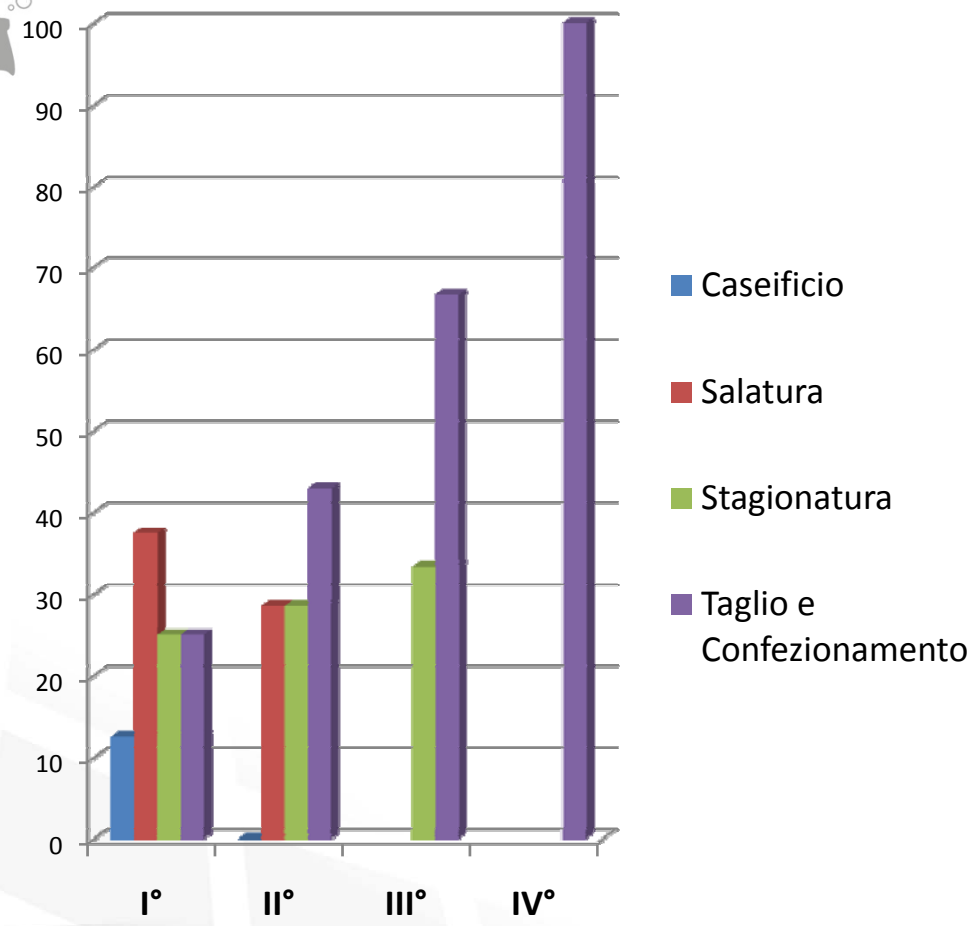
b) Il 20,6% delle superficie a contatto e il 23,8% delle non a contatto sono risultate contaminate da *L. monocytogenes*

c) ***Listeria* spp.** è stata rilevata in 2 campioni ambientali (2,2 %).



Stabilimento 2

Campionamenti ambientali e di prodotto



Stabilimento 2

a) **I° prelievo**: 8 campioni positivi (9%)
b) **II° prelievo** 7 campioni positivi (7,9%)
c) **III° prelievo** 3 campioni positivi (3,3%)
d) **IV° prelievo** 1 campioni positivi (1,1%)

Campionamenti ambientali e di prodotto

- Sono state analizzate 25 forme di gorgonzola (3 croste e 3 paste separatamente) appartenenti a 5 diversi lotti di produzione per un totale di 150 campioni (300 determinazioni)

- Su i 75 quarti di crosta 37 campioni (49,3%) sono risultati contaminati mentre le paste erano tutte negative

- Complessivamente il 16 delle forme (64%) erano positive.

Campionamenti ambientali e di prodotto

Lotti di produzione	Numero di campioni positivi alla ricerca di *L. monocytogenes*/n. campioni esaminati		Numero di forme positive alla ricerca di *L.* monocytogenes/n. forme esaminate
	Crosta	*pasta*	*Mezze forme*
1	12/15	0/15	5/5
2	11/15	0/15	4/5
3	0/15	0/15	0/5
4	12/15	0/15	5/5
5	2/15	0/15	2/5
Totale	**37/75**	**0/75**	**16/25**

Stabilimento 1

Campionamenti ambientali e di prodotto

Lotti di produzione	Range di contaminazione da *L. monocytogenes* (UFC/g)			
	0.04≤Lm≤100	101≤Lm≤1000	1001≤Lm≤10000	≥10000
1	1	3	3	5
2	0	4	1	6
3	0	0	0	0
4	4	1	0	7
5	0	0	0	2
Totale	**5**	**8**	**4**	**20**

Stabilimento 1

Campionamenti ambientali e di prodotto

- Sono state analizzate 25 forme di gorgonzola appartenenti a 5 diversi lotti di produzione per un totale di 150 campioni (300 determinazioni)

- Dei 75 quarti 23 campioni di crosta *(30,7%)* sono risultati positivi mentre le paste sono risultate negative.

- Complessivamente è emerso che 13 forme (48%) erano positive

Campionamenti ambientali e di prodotto

Lotti di produzione	Numero di campioni positivi alla ricerca di *L. monocytogenes*/n. campioni esaminati		Numero di forme positive alla ricerca di *L.* monocytogenes/n. forme esaminate
	Crosta	*pasta*	*forme*
1	11/15	0/15	5/5
2	7/15	0/15	5/5
3	6/15	0/15	3/5
4	0/15	0/15	0/5
5	0/15	0/15	0/5
Totale	**24/75**	**0/75**	**13/25**

Stabilimento 2

Campionamenti ambientali e di prodotto

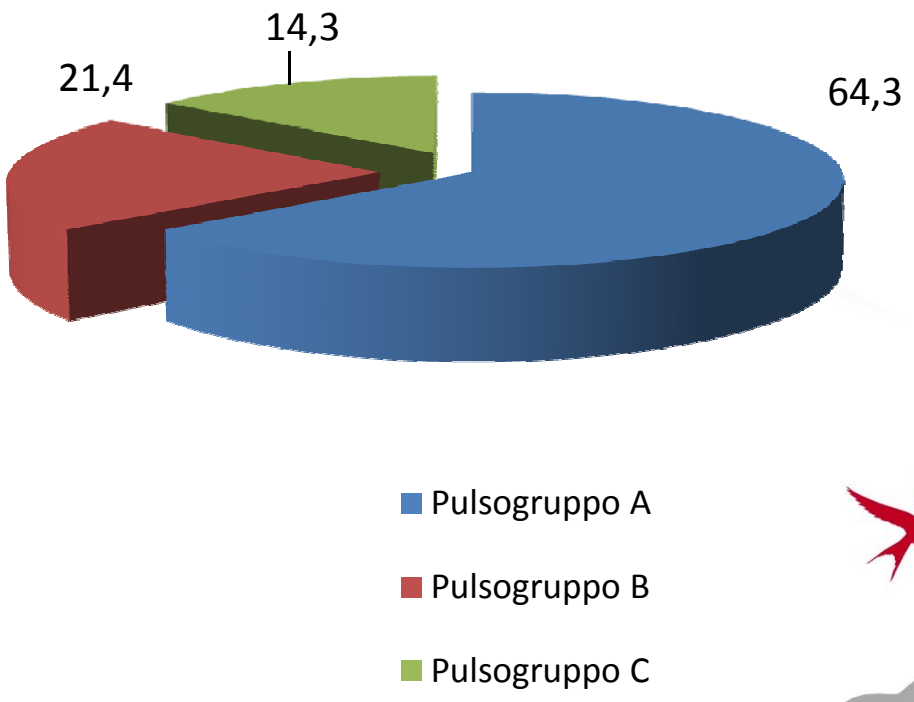
Lotti di produzione	Range di contaminazione da *L. monocytogenes* (UFC/g)			
	0.04≤Lm≤100	101≤Lm≤1000	1001≤Lm≤10000	≥10000
1	7	1	0	3
2	5	0	0	2
3	0	3	1	2
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
Totale	12	4	1	7

Stabilimento 2

Analisi dei ceppi di *L. monocytogenes*

Sierotipizzazione e PFGE

- Sono stati analizzati 14 ceppi
- 64,3% sierotipo 1/2a e 35,7% sierotipo 1/2b
- Sono stati riscontrati 3 pulsogruppi



Stabilimento 1

Sierotipizzazione e PFGE

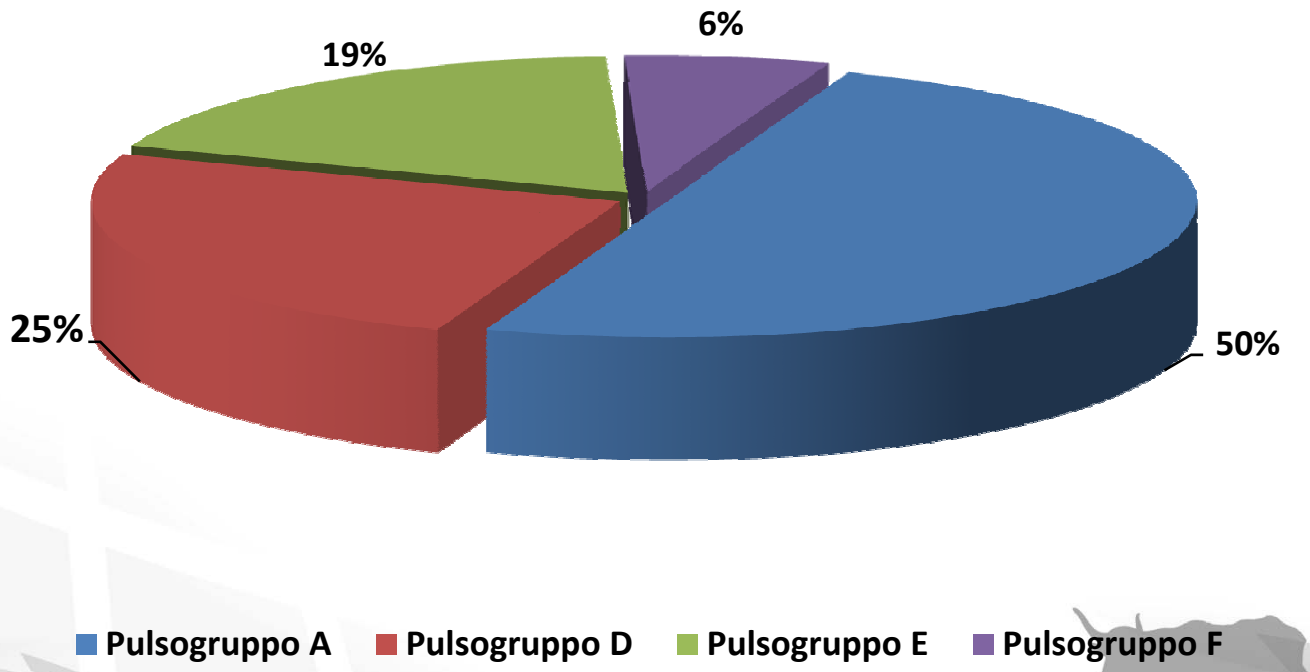
Area di lavorazione		Sierotipo 1/2 a	Sierotipo 1/2 b		Pulsotipo *Asc* I	Pulsotipo *Apa* I	Pulsogruppo	Prelievo
Caseificio	7,2%	100%			1	1	A	I°
Salatura	21,4%	33%			1	1	A	II°
			77%		2	2	B	I° III°
Stagionatura	50%	57,1%			1	1	A	I° III° IV°
			42,9%	28,6%	2	3	C	I° IV°
				14,3%	2	2	B	IV°
Taglio e confezionamento	21,4%	100%			1	1	A	II° III°

Stabilimento 1

Sierotipizzazione e PFGE

a) Tutti i ceppi appartenevano al sierotipo 1/2a

b) Sono stati riscontrati 4 pulsogruppi:



Stabilimento 2

Sierotipizzazione e PFGE

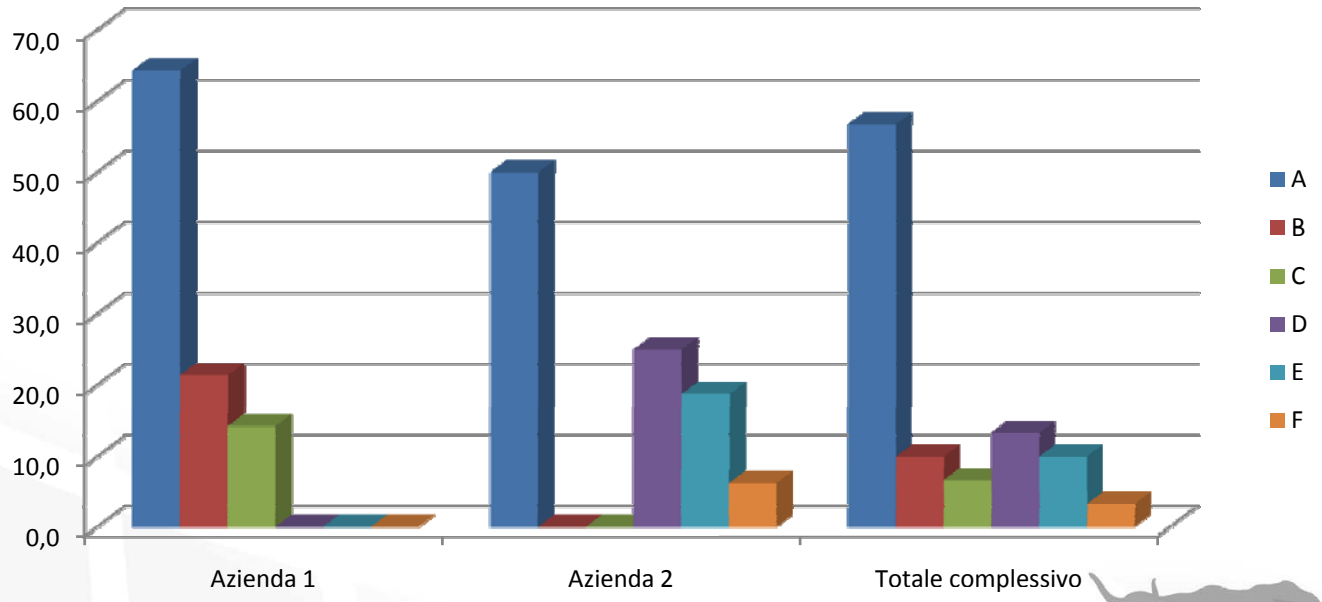
Area di lavorazione	Ceppi	Sierotipo 1/2 a	Pulsotipo AscI	Pulsotipo AscI	Pulsogruppo	Prelievo
Caseificio	6,2%	100%	4	4	E	I°
Salatura	18,8%	33,3%	1	1	A	I°
		33,3%	3	6	D	I°
		33,3%	4	4	E	I°
Stagionatura	31,3%	40%	1	1	A	III°
						IV°
		20%	3	6	D	I°
		20%	4	4	E	I°
		20%	5	5	F	IV°
Taglio e confezionamento	43,8%	71,4%	1	1	A	I°
						III°
		28,6%	3	6	D	III°

Stabilimento 2

Analisi dei ceppi di *L. monocytogenes*

a) Il 83,6% dei ceppi apparteneva al sierotipo 1/2a e il 16,4% al sierotipo 1/2b

b) Sono stati individuati 6 pulsogruppi



Analisi dei ceppi di *L. monocytogenes*

- ✓ La contaminazione delle **aree di lavorazione** risulta diffusa ed omogeneamente distribuita nelle due aziende considerate.
- ✓ La presenza di ceppi di *L. monocytogenes* sulle superficie non a contatto con il prodotto rappresenta un punto critico nella gestione delle procedure di pulizia e sanificazione
- ✓ La contaminazione delle aree di lavorazione da *Listeria* spp. indica un ambiente favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*
- ✓ Dalla analisi dei profili genetici dei ceppi isolati nelle due aziende si è individuato un pulsogruppo predominate (A) mentre gli altri sembrano avere una scarsa capacità di persistenza nelle aree di lavorazione vista la loro eliminazione con le normali procedure di sanificazione.

Analisi dei ceppi di *L. monocytogenes*

- ✓ Dalla analisi del **prodotto** si è evidenziato come la distribuzione di *L. monocytogenes* risulta disomogenea e puntiforme interessando un numero ridotto di porzioni

- ✓ Le analisi del **prodotto** hanno permesso di stabilire che la pasta a differenza della crosta fosse sempre non contaminata.

- ✓ La crosta si conferma un importante fonte di contaminazione e veicolo di contaminazione

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Analisi dei ceppi di *L. monocytogenes*

Microarray

Estrazione del DNA

Amplificazione con random primers ed incorporazione del fluoroforo Cy3

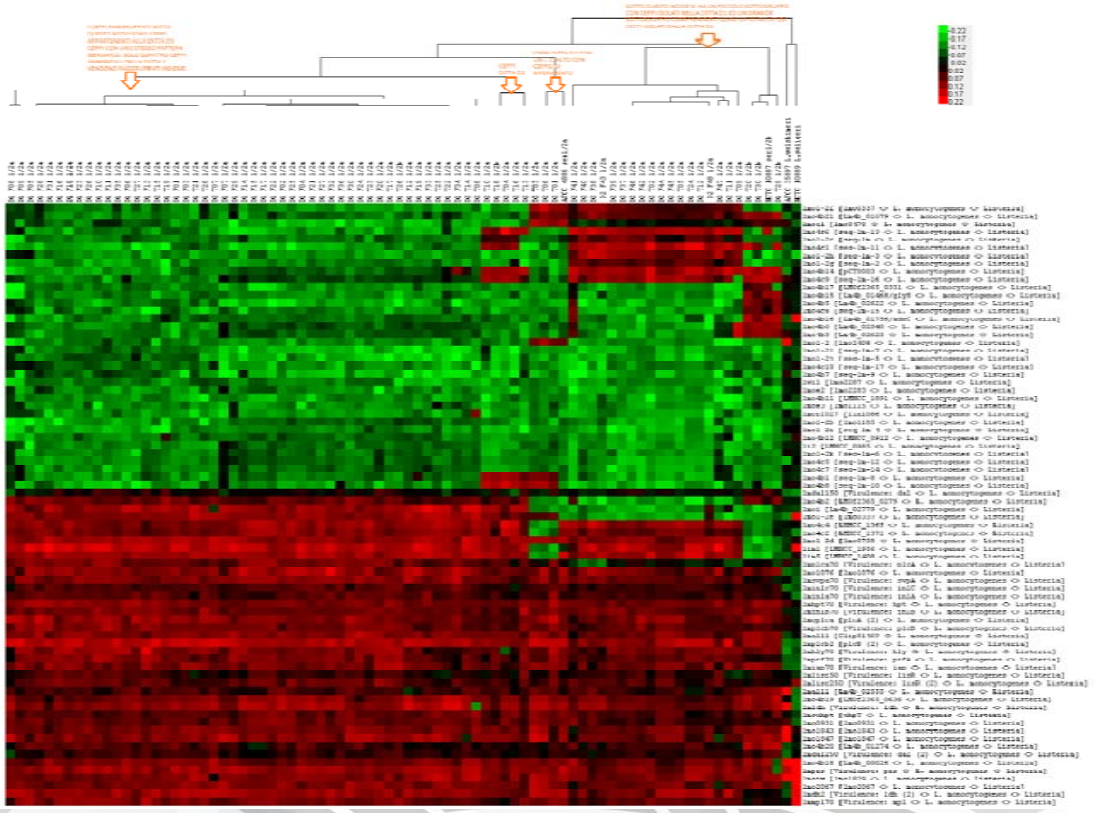
Lettura della purezza e della concentrazione del DNA al Nanodrops

Ibridazione a 42° C per 16h

Analisi dei ceppi di *L. monocytogenes*

Microarray

- Tutti i ceppi presentano i geni di virulenza.
- Il cluster generato dai ceppi isolati in entrambe le ditte riassume ciò che abbiamo visto nei due cluster precedenti ossia che nella ditta 2 ci sono ceppi con pattern genomico piu' eterogeneo rispetto ai ceppi isolati nella ditta 1.



IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Analisi dei ceppi di *L. monocytogenes*

Biofilm

TSB per 24h a 37° C

Tryptic soy agar

Crescita in TSB (Tryptic soy broth) e misurazione OD_{600}

12° C

37° C

BIOFILM

Incubazione per 72h a 37° C e 12° C per entrambi i substrati

SEM

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Analisi dei ceppi di *L. monocytogenes*

Biofilm

Teflon

ID campione	Pulsotipo	Sierotipo	Media OD 12 °C	Media OD 37 °C
D1 T20	2	1/2b	0.028	0.058
D2 T01	4	1/2a	0.100	0.041
D2 T09	5	1/2a	0.039	0.050
D2 T02	3	1/2a	0.043	0.019
D2 T07	1	1/2a	0.020	0.031

Acciaio

ID campione	Pulsotipo	Sierotipo	Media OD 12 °C	Media OD 37 °C
D1 T20	2	1/2b	0.030	0.137
D2 T01	4	1/2a	0.025	0.304
D2 T09	5	1/2a	0.036	0.126
D2 T02	3	1/2a	0.034	0.095
D2 T07	1	1/2a	0.0	0.115

I risultati sono stati analizzati attraverso il test ANOVA (limite di significatività P<0,05)

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Analisi dei ceppi di *L. monocytogenes*

Biofilm

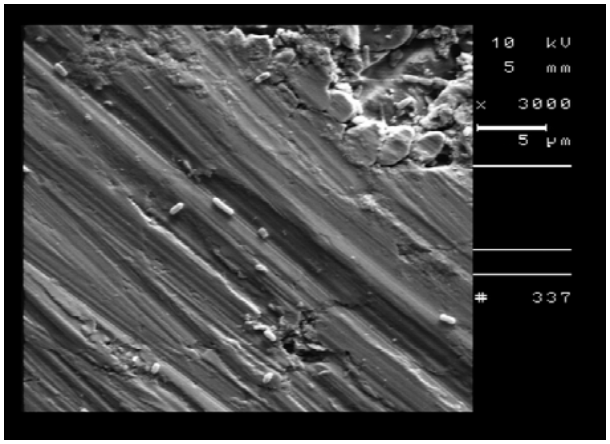
ID campione	Teflon 12 °C	Acciaio 12 °C	Teflon 37 °C	Acciaio 37 °C
D2 T02	+/-	+/-	+/-	+
D2 T01	+	+/-	+/-	++
D2 T07	+/-	+/-	+/-	+
D2 T09	+/-	+/-	+/-	+
D1 T20	+/-	+/-	+/-	+

+/+ CRESCITA ALTA **+/-** CRESITA BASSA **+** CRESCITA MEDIA

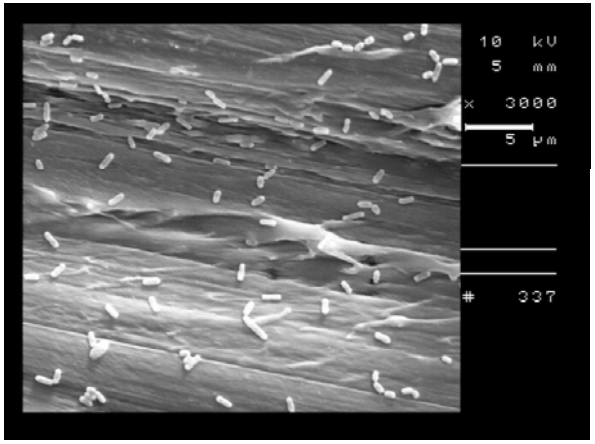
Biofilm

Campione D2 T01

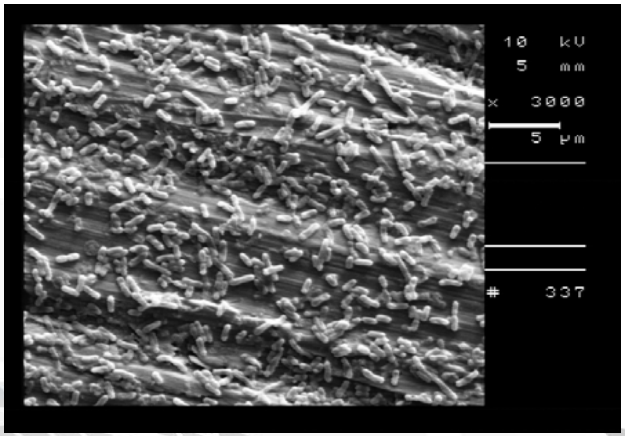
Acciaio a 12° C



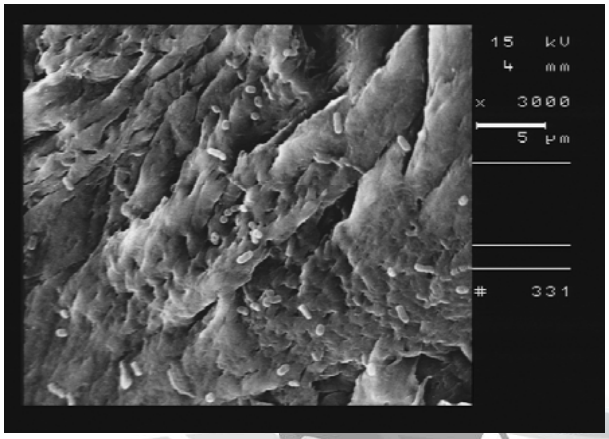
Teflon a 12° C



Acciaio a 37° C



Teflon a 37° C



Conclusioni

a) Assenza di contaminazione nucleo non elimina le preoccupazioni circa la sicurezza dei consumatori, considerando l'alta frequenza riportata in croste. Tuttavia le strategie di mitigazione, tra cui il miglioramento sanificazione e compartimentalizzazione della linea di lavorazione, hanno comportato una riduzione della contaminazione ambientale inizialmente diffusa in tutto il processo di produzione.

b) I nostri risultati potrebbero essere utilizzati per valutare e gestire i rischi associati al consumo di formaggio Gorgonzola. Tuttavia, ulteriori studi biomolecolari sono necessari al fine di ottenere una più profonda conoscenza delle dinamiche di contaminazione nelle diverse fasi del processo di produzione del formaggio Gorgonzola.

Collaborazioni e ringraziamenti

- IZS Brescia Dr Daminelli
- IZSAM - Microbiologia Diagnostica, Anatomo-Istopatologia, Parassitologia e Micologia Drssa Annarita D'Angelo

- Consorzio di tutela del Gorgonzola

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

GRAZIE !