



IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Risultati preliminari di un programma di monitoraggio di *Listeria monocytogenes* in uno stabilimento di prodotti caseari

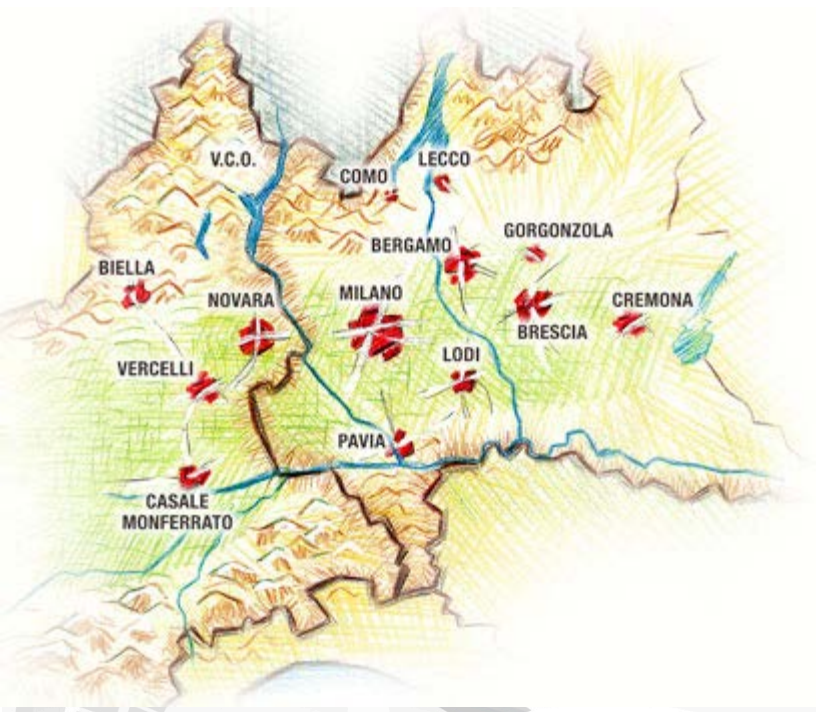
Francesca Cito

Giornata studio "Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes*"
Teramo, 15 Dicembre 2015




Background

Il gorgonzola è uno dei più antichi formaggi erborinati del mondo prodotto principalmente nelle regioni italiane **Piemonte e Lombardia** e preparato a partire dal latte vaccino intero pastorizzato.



Background

 *L. monocytogenes* rappresenta una preoccupazione primaria per la produzione di Gorgonzola sia per **l'alta frequenza di contaminazione** che per **i notevoli volumi commerciali** implicati.

In passato, l'analisi microbiologica effettuata su croste dei formaggi ha rilevato *L. monocytogenes* in **2-9% dei campioni** di gorgonzola.



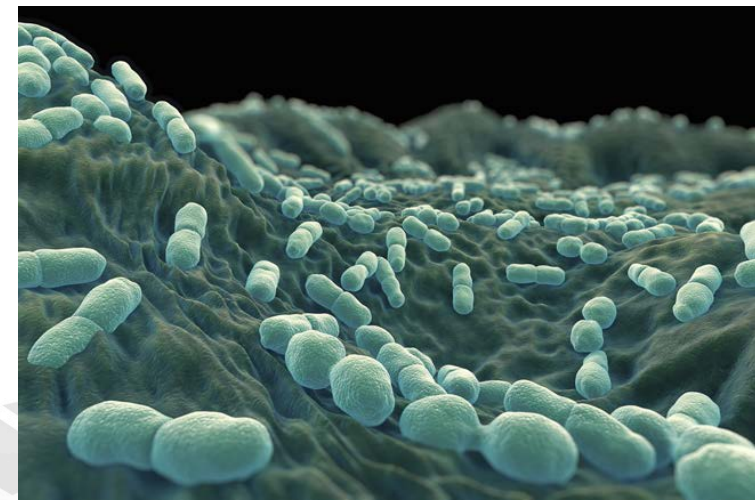
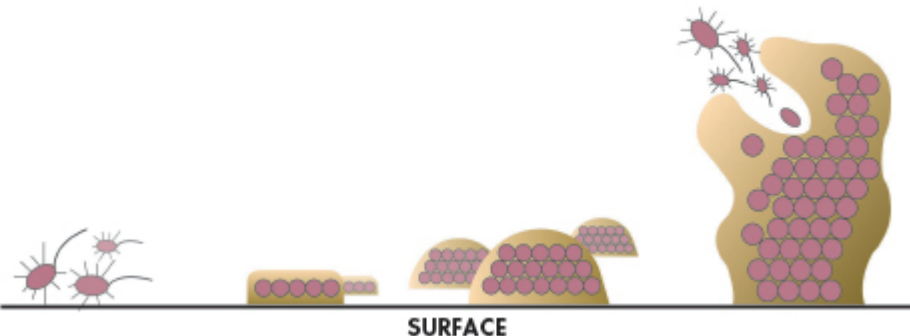
Background

Conoscere le dinamiche di contaminazione dell'agente patogeno nelle diverse fasi di produzione è **necessario** per identificare i **punti critici** da controllare nell'ambito dei piani HACCP. Tali informazioni sono inoltre fondamentali per **verificare l'efficacia dei sistemi di controllo** posti in atto dalle ditte produttrici.



Background

Pur potendo originare anche dalla produzione primaria, la fonte principale delle contaminazioni da *L. monocytogenes* è da riferire alla **persistenza** di questo batterio all'interno di **nicchie** con ambiente favorevole lungo le catene di lavorazione, dove è in grado di **moltiplicarsi** e persistere anche per lunghi periodi.



Collaborazione tra il Consorzio per la tutela del formaggio gorgonzola e il Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes*:

- definire le **misure di contenimento** in grado di eliminare o ridurre *L. monocytogenes* nelle aziende di lavorazione
- determinare il **livello di rischio** di listeriosi per il consumatore



Studio sulla presenza e persistenza di *Listeria monocytogenes* nel Gorgonzola e in ambienti di lavorazione

Obiettivo:

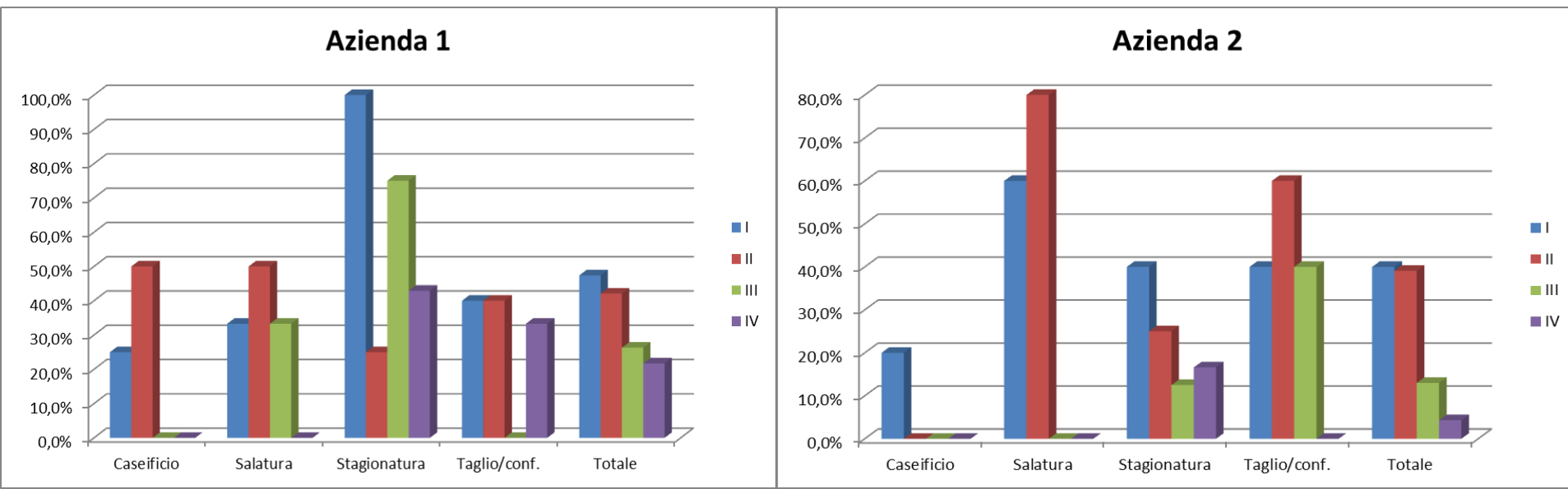
Valutare e quantificare i rischi di esposizione a *L. monocytogenes* del formaggio Gorgonzola nelle aziende produttrici al fine di definire correttamente approcci di sorveglianza mirati e ripianificare le azioni di controllo esistenti, nonché le procedure HACCP in corso.




Selezione degli stabilimenti

In base ai risultati provenienti da un precedente studio sulla contaminazione ambientale condotto presso due stabilimenti di produzione si è deciso di focalizzare l'attenzione su uno di questi.

Percentuali di campioni positivi a *Listeria* spp. nelle diverse aree dell'aziende 1 e 2 nelle quattro sessioni di campionamento



Campionamento

- 
- **Quattro** sessioni di indagine ambientale e sui prodotti in **tutte le aree di produzione** dello stabilimento.
 - Prelievi ambientali sia **prima** che **dopo** le procedure di **sanificazione**.
 - Campionamento ripetuto a distanza di **15, 30 e 60 giorni** dalla prima sessione, effettuando i prelievi negli stessi **identici punti**.
 - Campioni di crosta raccolti sia tramite raschiamento che con spugnette.






Numero e tipologia di campioni prelevati durante le quattro sessioni

Area lavorazione	Campioni su superfici a contatto	Campioni su superfici non a contatto	Campioni su prodotto	Totale
Caseificazione	80	80		160
Salatura	48	112		160
Stagionatura	56	104	96	256
Taglio / confezionamento	48	112	32	192
Totale	232	408	128	768

Analisi dei campioni

- 
- Isolamento
 - PCR
 - Serotyping
 - PFGE (*Apal, Ascl*)
 - WGS



I sessione di campionamento

Ambiente di lavorazione

Isolamento <i>L.m.</i>	Caseificio	Salatura	Stagionatura	Taglio/ confezionamento	Totale
Assente	40	17	14	17	88
Presente		3	6	3	12
Totale	40	20	20	20	100



I sessione di campionamento

Prodotto

Isolamento <i>L.m.</i>	Tampone Crosta	Raschiato Crosta	Bancale	Totale
Assente	31	31	32	94
Presente	1	1		2



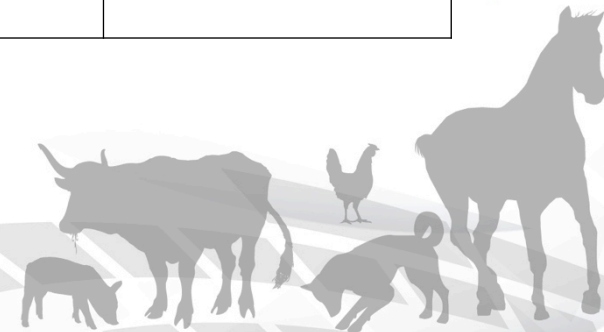
I sessione di campionamento

PCR

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	Totale
Ambiente	104	125	229
Prodotto	20	0	20
Totale	124	125	249

L. monocytogenes 49,8%

L. innocua 50,2%



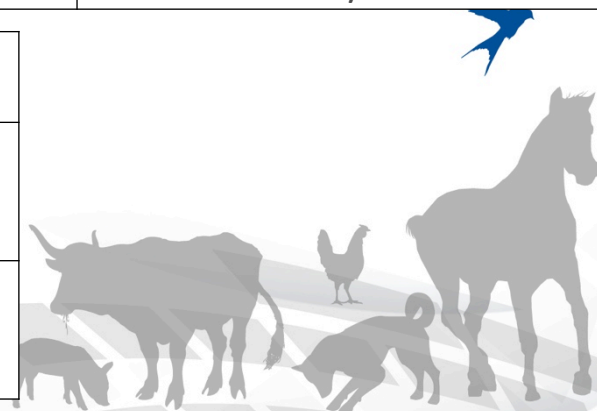
I sessione di campionamento

**Caratterizzazione
genetica dei ceppi
mediante PFGE**

Area	Pulsotipi (Ascl/Apal)
Salatura	29/32
	71/51
	181/238
Stagionatura	29/32
	71/17
	71/51
Taglio/ confezionamento	29/32
Prodotto	29/32
	71/17
	146/67

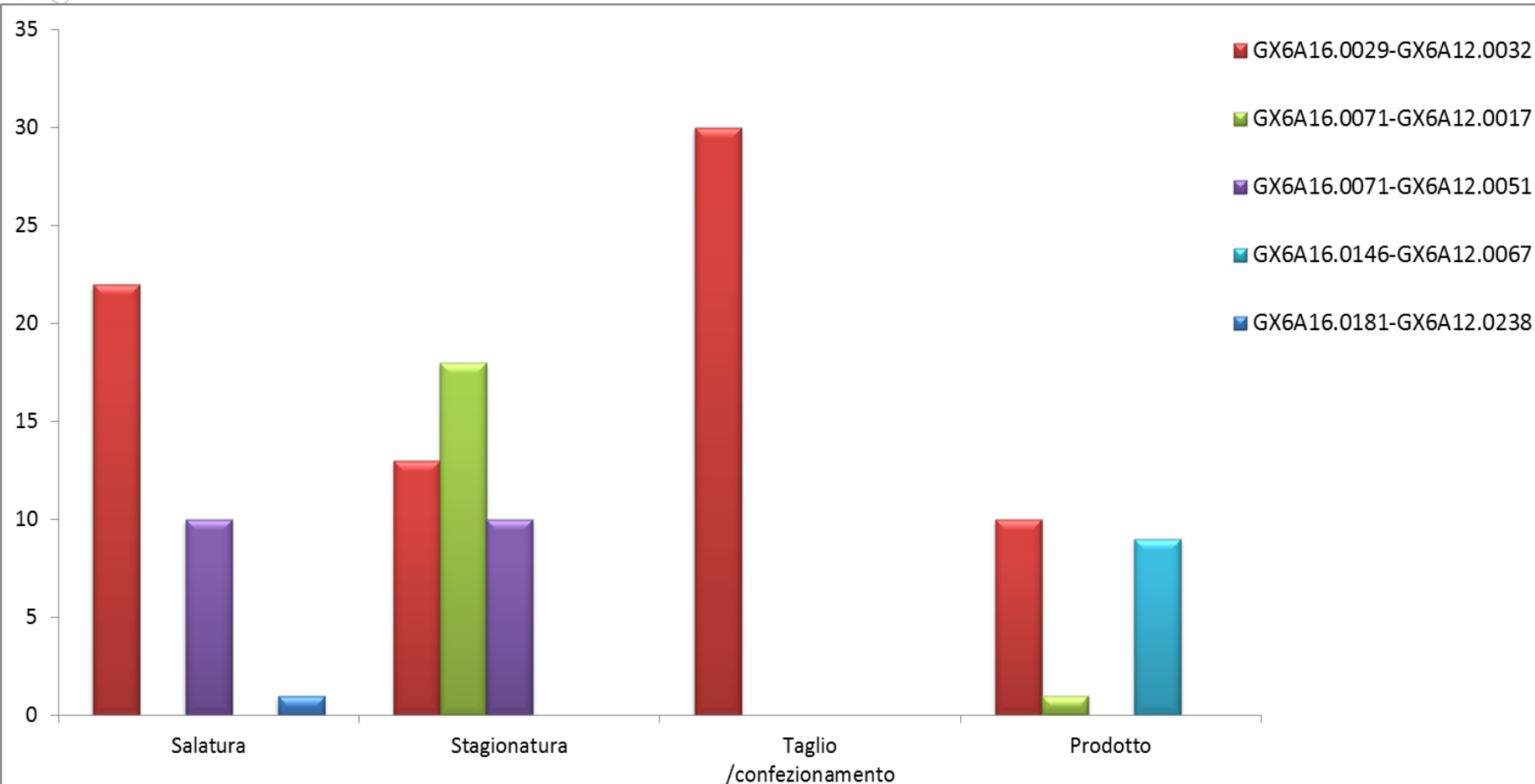
Numero di pulsotipi

Salatura	Stagionatura	Taglio/confezionamento	Prodotto	Totale
3	3	1	3	5



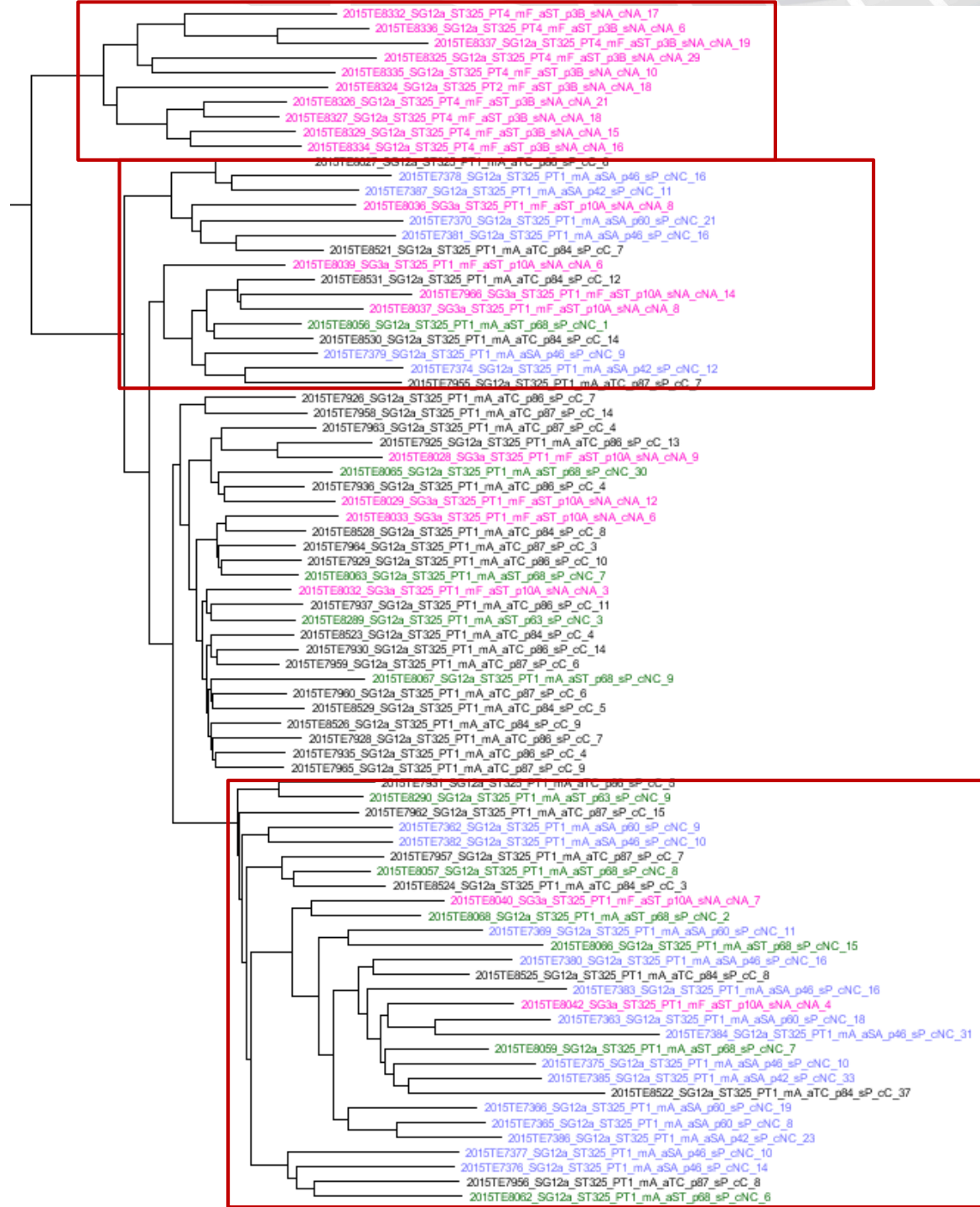
I sessione di campionamento

Distribuzione dei pulsotipi nelle diverse aree di lavorazione e nel prodotto



WGS

Albero NJ all SNPs
L. monocytogenes
sierotipo 1/2 a



- Prodotto
- Salatura
- Stagionatura
- Taglio e confezionamento


WGS

Albero NJ all SNPs
L. monocytogenes
sierotipo 1/2 b

- Salatura
- Stagionatura

2015TE8317_SG12b_ST3_PT2_mA_aST_p61_sP_cC_94
2015TE7952_SG12b_ST3_PT3_mA_aSA_p43_sP_cNC_0
2015TE7951_SG12b_ST3_PT3_mA_aSA_p43_sP_cNC_2
2015TE8049_SG12b_ST3_PT3_mA_aSA_p43_sP_cNC_3
2015TE8044_SG12b_ST3_PT3_mA_aSA_p43_sP_cNC_0
2015TE8052_SG12b_ST3_PT3_mA_aSA_p43_sP_cNC_1
2015TE8048_SG12b_ST3_PT3_mA_aSA_p43_sP_cNC_4
2015TE8055_SG12b_ST3_PT3_mA_aSA_p43_sP_cNC_0
2015TE8515_SG12b_ST3_PT3_mA_aST_p78_sP_cNC_2
2015TE8518_SG12b_ST3_PT3_mA_aST_p78_sP_cNC_2
2015TE8517_SG12b_ST3_PT3_mA_aST_p78_sP_cNC_4
2015TE8520_SG12b_ST3_PT3_mA_aST_p78_sP_cNC_4
2015TE8511_SG12b_ST3_PT3_mA_aST_p78_sP_cNC_1
2015TE8514_SG12b_ST3_PT3_mA_aST_p78_sP_cNC_0
2015TE8509_SG12b_ST3_PT3_mA_aST_p78_sP_cNC_2
2015TE8507_SG12b_ST3_PT3_mA_aST_p78_sP_cNC_1
2015TE8513_SG12b_ST3_PT3_mA_aST_p78_sP_cNC_1
2015TE8045_SG12b_ST3_PT3_mA_aSA_p43_sP_cNC_6
2015TE8519_SG12b_ST3_PT3_mA_aST_p78_sP_cNC_5
2015TE8298_SG12b_ST3_PT2_mA_aST_p63_sP_cNC_19
2015TE8320_SG12b_ST3_PT2_mA_aST_p61_sP_cC_2
2015TE8291_SG12b_ST3_PT2_mA_aST_p63_sP_cNC_1
2015TE8543_SG12b_ST3_PT1_mA_aST_p69_sP_cC_0
2015TE8267_SG12b_ST3_PT1_mA_aST_p69_sP_cC_3
2015TE8273_SG12b_ST3_PT2_mA_aST_p69_sP_cC_3
2015TE8268_SG12b_ST3_PT1_mA_aST_p69_sP_cC_1
2015TE8269_SG12b_ST3_PT1_mA_aST_p69_sP_cC_3
2015TE8292_SG12b_ST3_PT2_mA_aST_p63_sP_cNC_4
2015TE8257_SG12b_ST3_PT1_mA_aST_p69_sP_cC_4
2015TE8240_SG12b_ST3_PT2_mA_aST_p69_sP_cC_0
2015TE8258_SG12b_ST3_PT1_mA_aST_p69_sP_cC_6
2015TE8297_SG12b_ST3_PT2_mA_aST_p63_sP_cNC_4
2015TE8241_SG12b_ST3_PT1_mA_aST_p69_sP_cC_0
2015TE8296_SG12b_ST3_PT2_mA_aST_p63_sP_cNC_0



- 
- I risultati preliminari suggeriscono la presenza di una popolazione di *Listeria monocytogenes* estremamente **conservata** all'interno dello stabilimento
 - I ceppi si trasferiscono da un ambiente di lavorazione all'altro probabilmente attraverso il **movimento** delle attrezzature e del personale
 - L'esito delle analisi sui ceppi isolati dai successivi campionamenti consentirà di verificare la presenza di **ceppi persistenti** e di definire approcci di sorveglianza mirati alla risoluzione del problema



Ringraziamenti

 **COVEPI**
Centro di Referenza Nazionale

- COVEPI
- Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria Monocytogenes*
- Ricerca, sviluppo e biotecnologie
- Consorzio per la Tutela del Formaggio Gorgonzola DOP

