




*Listeria monocytogenes*

Laboratorio Nazionale di Riferimento

## Prove di trascinamento di *Listeria monocytogenes* nel sezionamento dei formaggi: procedura per la contaminazione artificiale delle croste

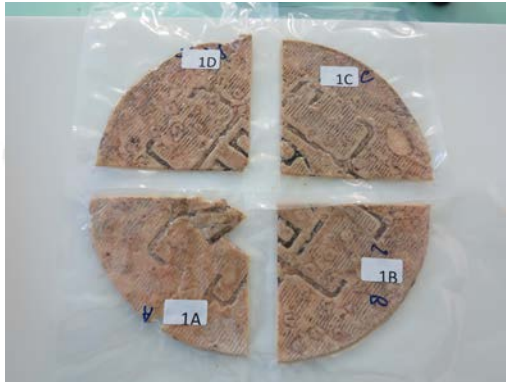
Patrizia Tucci e Anna Franca Sperandii  
Teramo, 16 dicembre 2015

# Introduzione

- 
- Lo studio si colloca all'interno di un progetto che prevede la stima del rischio per il consumatore di sviluppare listeriosi attraverso il consumo di formaggio gorgonzola.
  - È stata sviluppata una procedura di contaminazione delle croste del formaggio con l'obiettivo di ottenere una distribuzione di *Listeria monocytogenes* omogenea e a concentrazione nota, al fine di determinare il trascinamento batterico nel corso delle operazioni di sezionamento delle forme di formaggio.

# Principali fasi della procedura di contaminazione

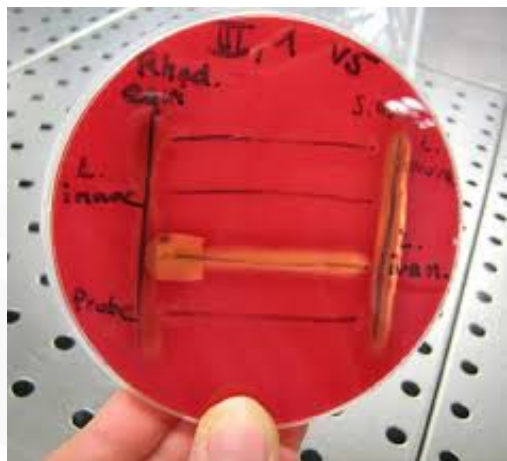
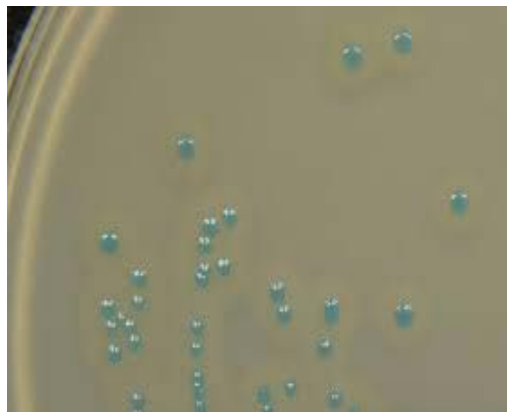
1. Acquisizione delle croste presso gli stabilimenti
2. Divisione delle croste in quattro parti
3. Confezionamento sottovuoto dei singoli quarti
4. Trattamento con Alte Pressioni Idrostatiche (600 MPa per 3 minuti)
5. Contaminazione con *L. monocytogenes*
6. Valutazione del livello di contaminazione e dell'omogeneità della crosta



# Selezione e preparazione dei ceppi batterici

- La sospensione per la contaminazione è stata preparata con una miscela di 3 ceppi di *L. monocytogenes*:
  - ✓ ATCC 13M ATCC 7644
  - ✓ EURL 12MOB118LM
  - ✓ IZSAM2015/479/2ATQ isolato da gorgonzola

- La procedura seguita per la preparazione della sospensione di inoculo (criteri di selezione, curve di crescita, adattamento) ha fatto riferimento alle linee guida del Laboratorio Europeo di Riferimento per *Lm*



# Preparazione della sospensione di contaminazione

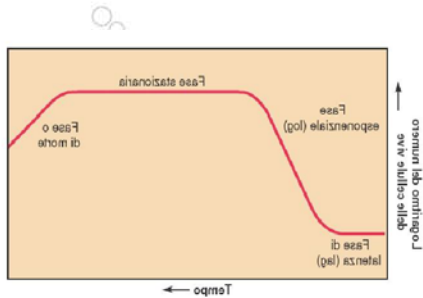


Figura 2.1. La curva della crescita microbica in un sistema chiuso. Le quattro fasi della curva di crescita sono indicate nel grafico e descritte nel testo.

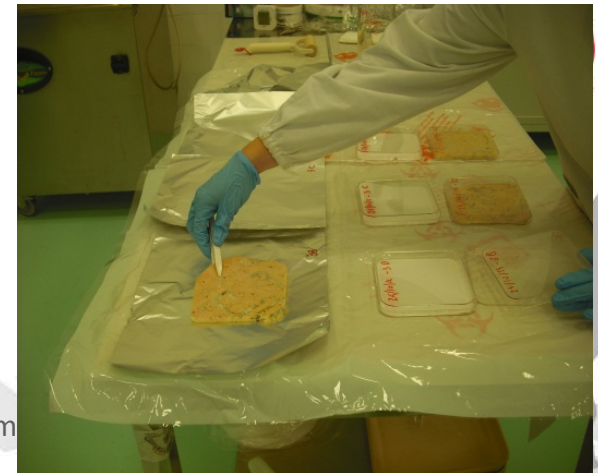
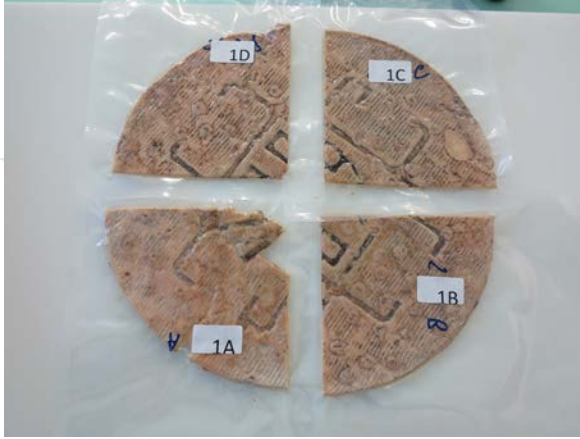


- Preparazione della brodocoltura con ogni singolo ceppo
- Adattamento dei 3 ceppi alla temperatura di conservazione del formaggio ( $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), fino al raggiungimento della fase stazionaria di crescita
- Preparazione (unione in parti uguali delle sospensioni dei 3 ceppi di *Lm*),
- Titolazione della mix
- Contaminazione delle croste con una sospensione di  $8 \log_{10}$  UFC/ml
- Determinazione della concentrazione di *Lm* nella crosta contaminata

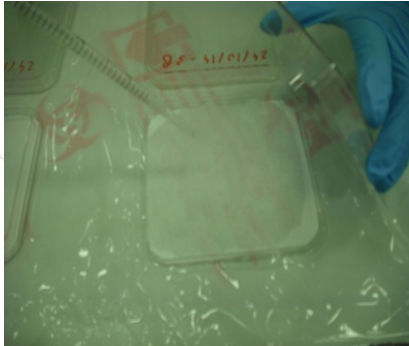


# Preparazione delle croste

- ❑ Ritagliare da una crosta intera - trattata con le alte pressioni - quattro quadrati 12x12cm (stesse dimensioni delle piastre Petri Microglass).
- ❑ Contaminare tre quadrati
- ❑ Lasciare il quarto come controllo per misurare l'aw
- ❑ Tagliare 4 fogli di carta assorbente della stessa forma e dimensione dei quadrati di crosta



# Contaminazione delle croste



- ❑ Sistemare all'interno della piastra (Petri Microglass 12x12cm) il foglio di carta assorbente e imbibire con 2,2 ml di una sospensione di *Lm*  $8 \log_{10}$  UFC/ml
- ❑ Porre con una pinzetta sterile il foglio imbibito sul quadrante di crosta
- ❑ Coprire il tutto con carta stagnola e applicare una leggera pressione sulla superficie per circa 10 secondi, con un rullino, per assicurare un maggior rilascio della sospensione e una migliore adesione dei microrganismi sulla superficie

# Contaminazione delle croste

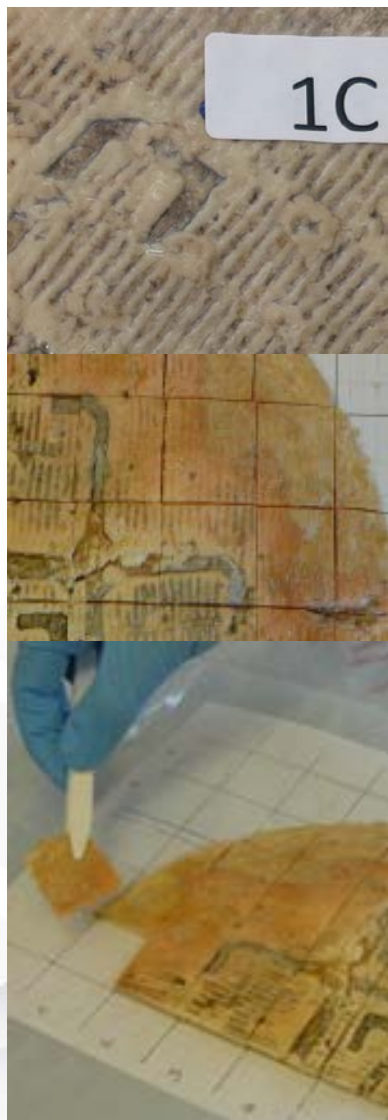
- ❑ Lasciare a contatto per 7 minuti, quindi rimuovere il foglio di carta assorbente
- ❑ Porre le croste contaminate ad asciugare su di un vassoio, sotto cappa a flusso laminare per 10 minuti (tempo necessario per ripristinare i valori di aw alla media delle aw nei quadrati di controllo)
- ❑ Confezionare le croste sotto vuoto in buste in polietilene, conservare a  $4 \pm 2$  °C ed analizzare dopo 24 ore





# Prelievo e analisi dei campioni

- ❑ Dividere le croste contaminate e quelle di controllo in quadratini delle dimensioni di 3x3cm
- ❑ Identificare i quadratini con codice alfanumerico
- ❑ Analizzare singolarmente i quadratini
- ❑ Eseguire la conta di *Lm* con i metodi:
  - MPN-USDA/FSIS-MLG-8.07
  - ISO11290-2:98/ Amendment 1:2004 (Conta in piastra)
- ❑ Determinare l'aw (metodo ISO 21807:2004)




# Valutazione dell'omogeneità

- Complessivamente sono stati esaminati 12 quadranti di crosta:
  - ✓ 4 di controllo
  - ✓ 8 contaminati
  
- Ogni quadrante è stato sezionato in **16 quadratini 3x3cm**, per un totale di **128 determinazioni**

crosta	superficie cm2	quantità di mix	tempo di contatto	asciugatura minuti
quadrato	125	2,2	7	10
un quarto	177	3,1	7	10
metà	353	6,2	7	10
intera	707	12,4	7	10

- Confronto tra i valori medi di aw - dopo 10 minuti di asciugatura - nei campioni di controllo e campioni contaminati

Quadrante	Metodo	Risultato	SD	Valore minimo	Valore massimo
1	CTR	0,954	0,001	0,952	0,955
1	CONTAMINATO	0,953	0,001	0,952	0,954
2	CTR	0,941	0,001	0,940	0,943
2	CONTAMINATO	0,942	0,001	0,941	0,944
3	CTR	0,953	0,001	0,951	0,954
3	CONTAMINATO	0,952	0,001	0,950	0,953
4	CTR	0,941	0,001	0,940	0,942
4	CONTAMINATO	0,940	0,001	0,939	0,941



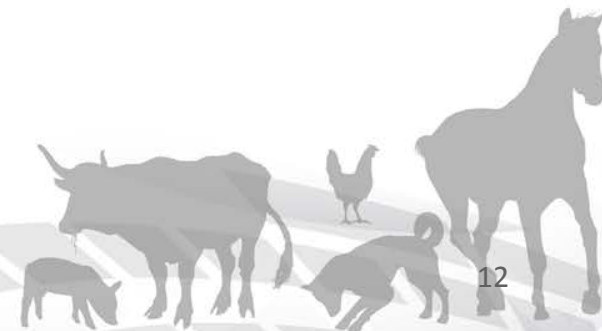
	A	B	C	D
1	5,7	5,1	4,7	5,0
2	5,2	5,3	5,2	4,7
3	5,4	5,0	5,3	5,1
4	5,4	5,1	5,2	NRG23543


	A	B	C	D
1	5,2	5,3	5,7	5,4
2	4,9	5,7	5,3	5,1
3	4,6	5,3	5,4	5,5
4	5,1	5,3	5,1	NRG33220

	A	B	C	D
1	5,3	5,0	4,5	5,0
2	5,2	5,7	5,2	5,7
3	5,1	5,3	5,7	5,1
4	4,9	5,0	5,2	NRG33222

	A	B	C	D
1	5,3	5,3	5,1	4,7
2	4,6	5,3	4,7	4,9
3	4,7	4,9	5,1	5,0
4	4,3	4,6	4,8	NRG33225

	4,0 log <sub>10</sub> - 4,9 log <sub>10</sub> UFC/cm <sup>2</sup>
	5,0 log <sub>10</sub> - 6,0 log <sub>10</sub> UFC/cm <sup>2</sup>
	4,0 log <sub>10</sub> - 4,9 log <sub>10</sub> MPN/cm <sup>2</sup>
	5,0 log <sub>10</sub> - 6,0 log <sub>10</sub> MPN/cm <sup>2</sup>





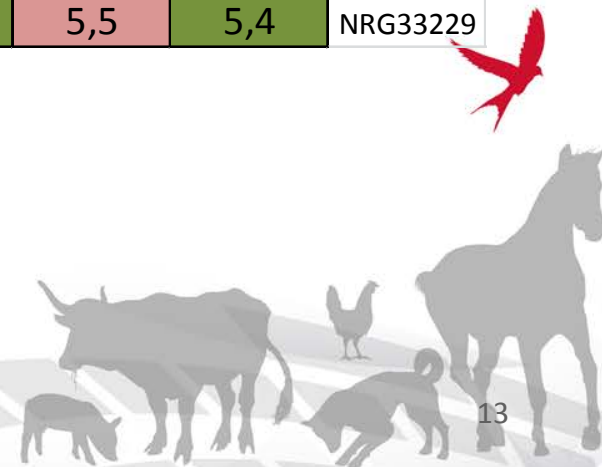
	A	B	C	D
1	4,7	4,5	5,1	4,0
2	4,1	4,3	4,3	4,1
3	5,3	4,0	4,3	4,2
4	4,3	4,0	4,1	NRG33226

	A	B	C	D
1		5,8		5,9
2	5,5		5,9	5,8
3		5,9	5,8	5,7
4	5,3	5,2	5,4	NRG33232

	A	B	C	D
1	5,8	5,5	5,8	5,4
2	5,7	5,7	5,1	5,3
3	5,8	5,5	5,7	5,4
4	5,3	5,8	5,7	NRG33228

	A	B	C	D
1	5,3	5,3	5,4	5,1
2	5,4	5,2	5,1	5,4
3	5,8	4,9	5,4	5,4
4	5,2	5,5	5,4	NRG33229

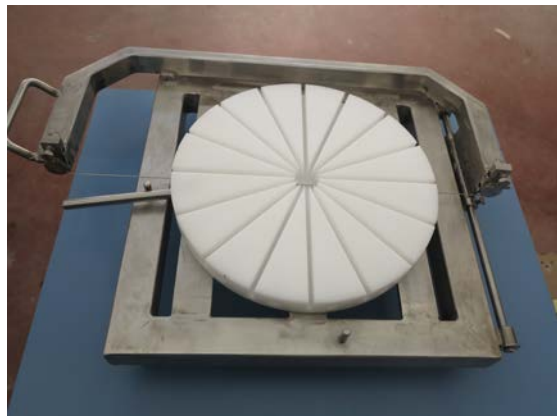
	4,0 log <sub>10</sub> - 4,9 log <sub>10</sub> UFC/cm <sup>2</sup>
	5,0 log <sub>10</sub> - 6,0 log <sub>10</sub> UFC/cm <sup>2</sup>
	4,0 log <sub>10</sub> - 4,9 log <sub>10</sub> MPN/cm <sup>2</sup>
	5,0 log <sub>10</sub> - 6,0 log <sub>10</sub> MPN/cm <sup>2</sup>



# Livello di contaminazione e omogeneità di *Lm*

Con il sistema di contaminazione descritto è stata ottenuta una concentrazione media di 5 log<sub>10</sub> (ufc/cm<sup>2</sup> o MPN/cm<sup>2</sup> partendo da una sospensione di 8 log<sub>10</sub> UFC/ml).

Quadrante	Metodo	Risultato log <sub>10</sub>	SD	Valore minimo	Valore massimo
1	ISO	5,15	0,13	5,01	5,43
1	MPN-USDA FSIS	5,16	0,37	4,67	5,69
2	ISO	5,22	0,20	4,90	5,51
2	MPN-USDA FSIS	5,28	0,39	4,59	5,72
3	ISO	5,10	0,14	4,90	5,30
3	MPN-USDA FSIS	5,28	0,45	4,49	5,74
4	ISO	4,77	0,30	4,27	5,32
4	MPN-USDA FSIS	5,00	0,28	4,64	5,34
5	ISO	4,18	0,19	3,99	4,51
5	MPN-USDA FSIS	4,52	0,51	4,01	5,30
6	ISO	5,67	0,25	5,26	5,93
6	MPN-USDA FSIS				
7	ISO	5,40	0,22	5,06	5,75
7	MPN-USDA FSIS	5,69	0,16	5,30	5,78
8	ISO	5,19	0,18	4,89	5,42
8	MPN-USDA FSIS	5,42	0,18	5,15	5,79



- ❑ In letteratura sono descritti diversi metodi per la contaminazione superficiale degli alimenti. L'EU-RL per *Lm* ha recentemente indicato l'impiego di un aerografo («airbrush» - documento EURL V1-29/01/2015).
- ❑ Il metodo proposto, non descritto in letteratura, consente di ottenere livelli di **ripetibilità**, **riproducibilità** e **omogeneità** adeguati per la conduzione di prove di trascinamento alla concentrazione di interesse.
- ❑ Il metodo di contaminazione è stato utilizzato per le prove di trascinamento eseguite con taglierina manuale (risultati in fase di elaborazione).
- ❑ Sarà utilizzato nelle operazioni di sezionamento con coltello e a ultrasuoni delle forme di formaggio.





IZSAM G. CAPORALE  
TERAMO

 *Listeria monocytogenes*  
Laboratorio Nazionale di Riferimento



# Grazie per l'attenzione

