



IZSAM G. CAPORALE  
TERAMO


**Frequenza e dinamiche di contaminazione da  
*Listeria monocytogenes* in forme di Gorgonzola DOP**

**Francesca Cito**

Giornata studio “Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes*”  
Teramo, 14 Dicembre 2017



# Il problema


- 
- La contaminazione da *Listeria monocytogenes* è stata spesso associata con **formaggi a pasta molle** e a **pasta erborinata**.
  - L'applicazione del trattamento termico è generalmente **sufficiente per inattivare** l'agente patogeno presente nel latte crudo.
  - Tuttavia, la *Listeria* può contaminare il formaggio nell'ambiente di **stagionatura** durante le fasi successive alla produzione.
  - Le caratteristiche di *L. monocytogenes* e del prodotto consentono al patogeno di **sopravvivere e moltiplicarsi** durante la maturazione e la conservazione.
  - La contaminazione, se presente, sembra essere limitata alla **crosta**
  - Tuttavia *L. monocytogenes* può comunque rappresentare un pericolo per la salute dei consumatori dato che la contaminazione può essere trasferita alla pasta durante l'**affettatura**.






Once  
Upon  
A  
TIME

# Obiettivi dello studio

- 
1. Valutare la frequenza di contaminazione della crosta e della pasta alla fine del processo di stagionatura, prima che il formaggio sia sottoposto ad affettatura
  2. Stimare l'entità della contaminazione superficiale della crosta
  3. Valutare la frequenza e la quantità di trasferimento della contaminazione dalla crosta alla pasta durante l'affettatura, considerando i diversi strumenti utilizzati per il taglio:
    - taglierina a filo
    - taglierina ad ultrasuoni
  4. Stimare la curva di crescita di *Listeria monocytogenes* durante il periodo di conservazione del formaggio
  5. Valutare la frequenza di contaminazione della crosta in seguito alle misure di prevenzione adottate dalle aziende




# 1. Valutare la frequenza di contaminazione della crosta e della pasta alla fine del processo di stagionatura, prima che il formaggio sia sottoposto ad affettatura

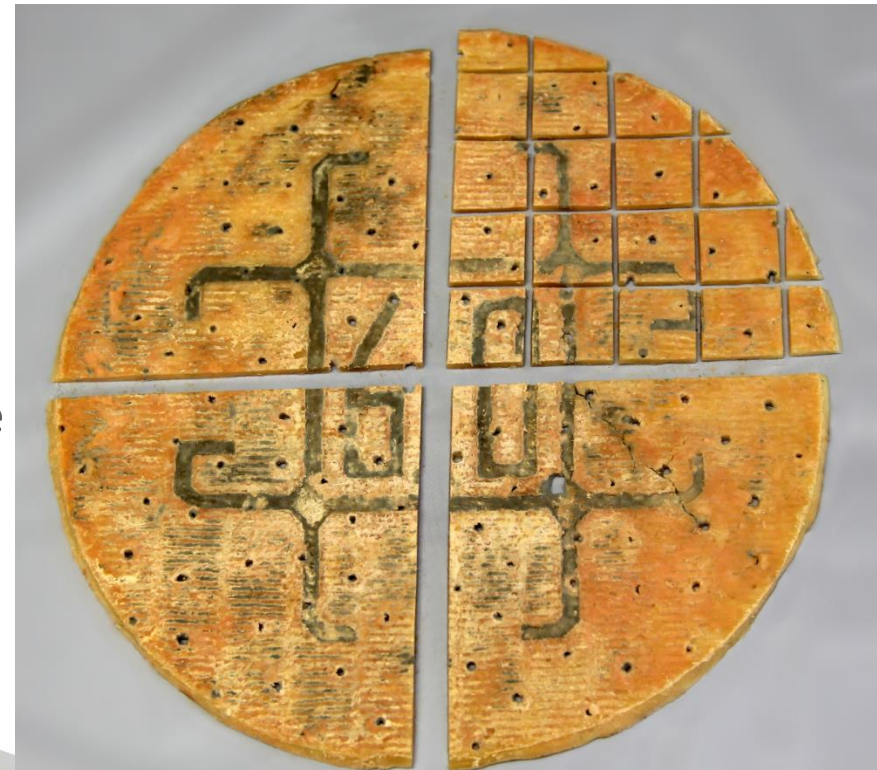
- 
- **70 campioni** di gorgonzola, ciascuno di metà forma, sono stati raccolti in due stabilimenti appartenenti al consorzio del formaggio gorgonzola
  - In ciascun campione, la crosta e la pasta sono state analizzate separatamente
  - Per quanto riguarda la crosta, è stata analizzata solo la faccia piatta perché nello «scalzo» la contaminazione non è mai stata rilevata
  - La faccia è stata suddivisa in **quattro parti**, tre delle quali sono state analizzate senza ulteriore suddivisione per valutare la contaminazione complessiva da *Listeria monocytogenes*



# 1. Valutare la frequenza di contaminazione della crosta e della pasta alla fine del processo di stagionatura, prima che il formaggio sia sottoposto ad affettatura

- 
- Nel caso di risultato positivo di almeno una delle tre parti testate, la quarta parte è stata ulteriormente suddivisa in una griglia di **piccoli quadrati di 3x3 cm** e ogni quadrato è stato analizzato separatamente.

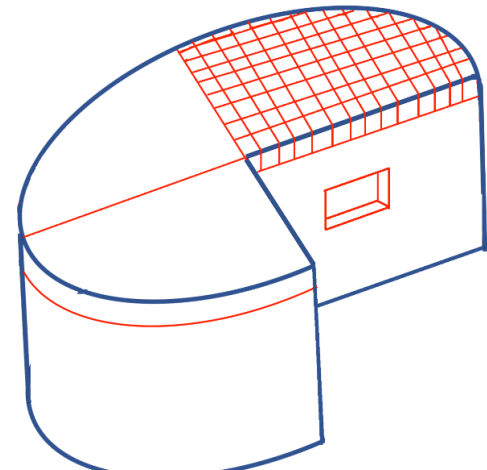
- In ogni ultimo quarto del formaggio, il numero medio di quadrati era 21,9 (intervallo 18-24)
- Ciascun quadratino è stato pesato ed è stata misurata l'area della superficie esterna, per trasformare la concentrazione di *Listeria*/grammo in *Listeria*/cm<sup>2</sup>




# 1. Valutare la frequenza di contaminazione della crosta e della pasta alla fine del processo di stagionatura, prima che il formaggio sia sottoposto ad affettatura



- Per quanto riguarda la pasta, sono stati raccolti asetticamente in profondità e analizzati **tre campioni** per ogni forma di gorgonzola
- Dal momento che la *Listeria monocytogenes* è un contaminante superficiale della crosta del formaggio gorgonzola, i campioni da testare batteriologicamente sono stati presi in considerazione raccogliendo un parallelepipedo di crosta e di pasta sottostante di cui sono stati misurati i lati ed è stato registrato il peso.
- Sulla base delle misure dei lati di questo parallelepipedo, la contaminazione per grammo è stata convertita in una contaminazione per  $\text{cm}^2$  di superficie.

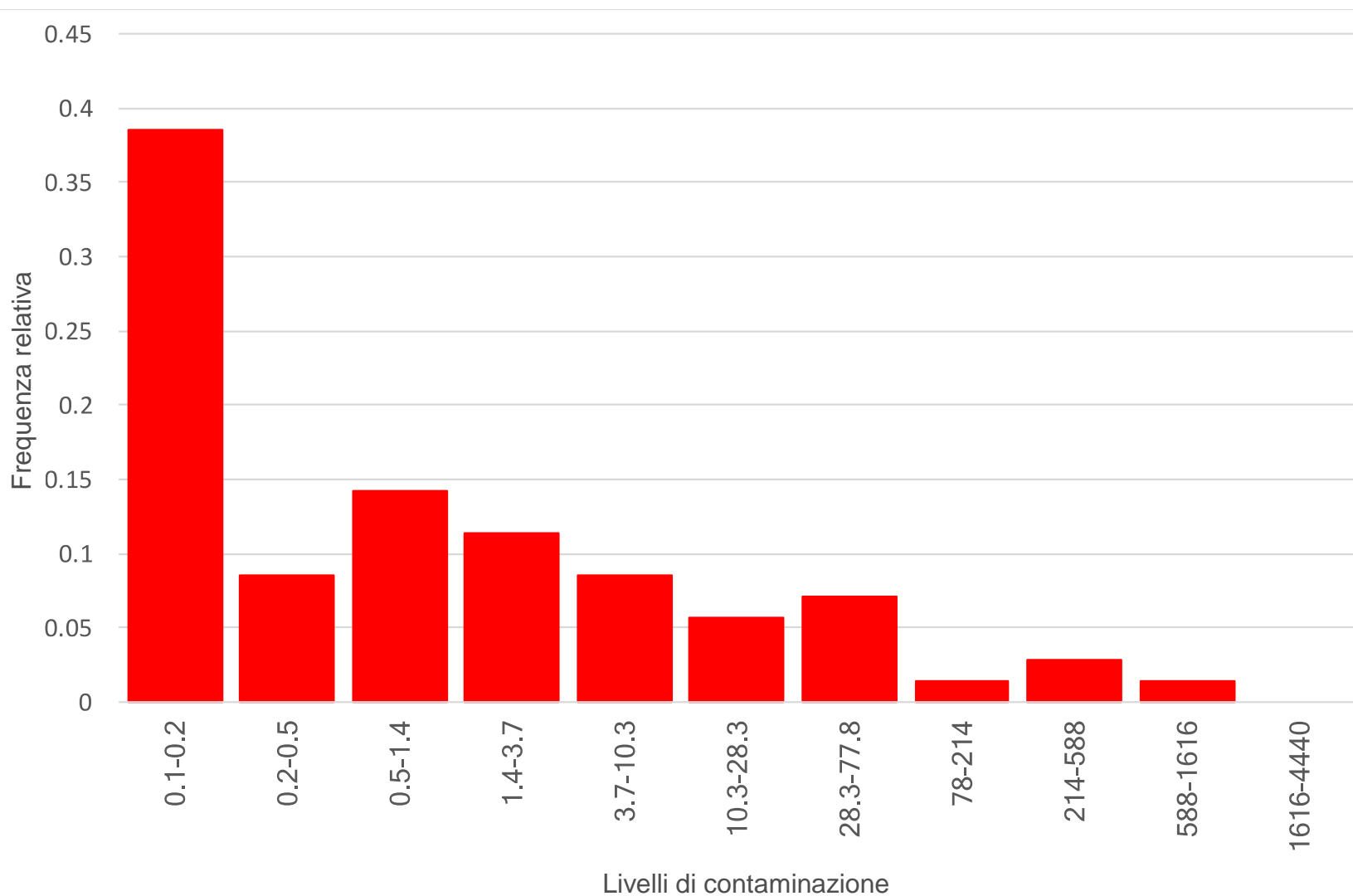


- 
- Sono stati analizzati **70** campioni di crosta
  - **44** di questi (62,9%) sono risultati **positivi**
  - Di ciascuna forma di formaggio, la media geometrica pesata della contaminazione misurata in ciascuno dei quarti è stata considerata la contaminazione media di quella forma
  - La media geometrica della contaminazione di tutte le croste era di **0,947** cellule batteriche/cm<sup>2</sup>, con una probabilità del 95% di essere compresa tra 0,511 e 1,753.
  - Tutti i campioni di pasta raccolti (n=250) sono risultati **negativi** per *Listeria monocytogenes*.






## Distribuzione di frequenza della media geometrica del numero di cellule batteriche/cm<sup>2</sup> in ciascuna crosta

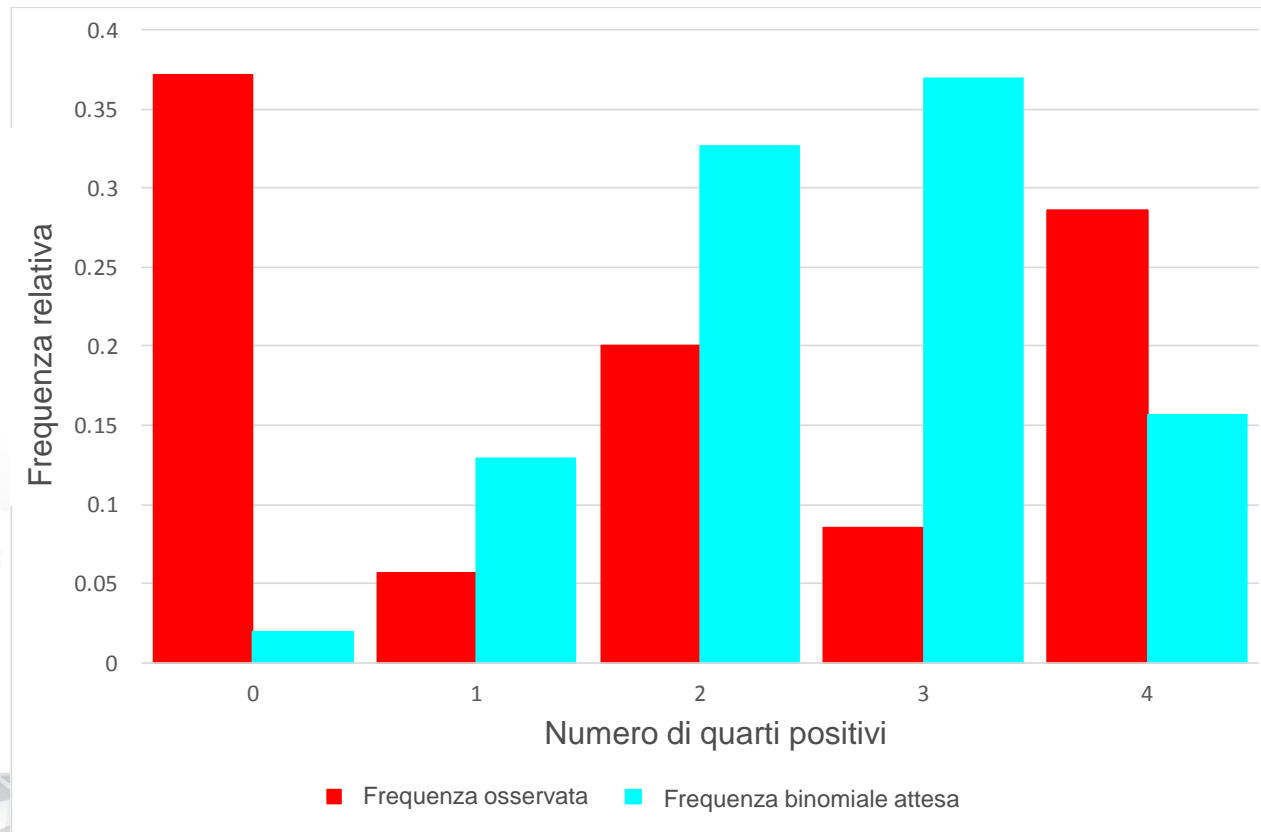


## 2. Stimare l'entità della contaminazione superficiale della crosta

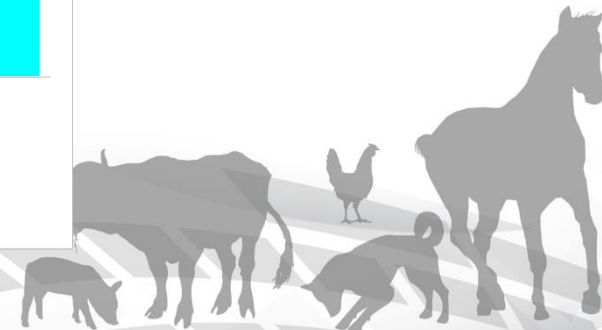

### Distribuzione di frequenza del numero di quarti positivi



La contaminazione non era uniformemente distribuita sulla superficie della crosta delle forme contaminate.

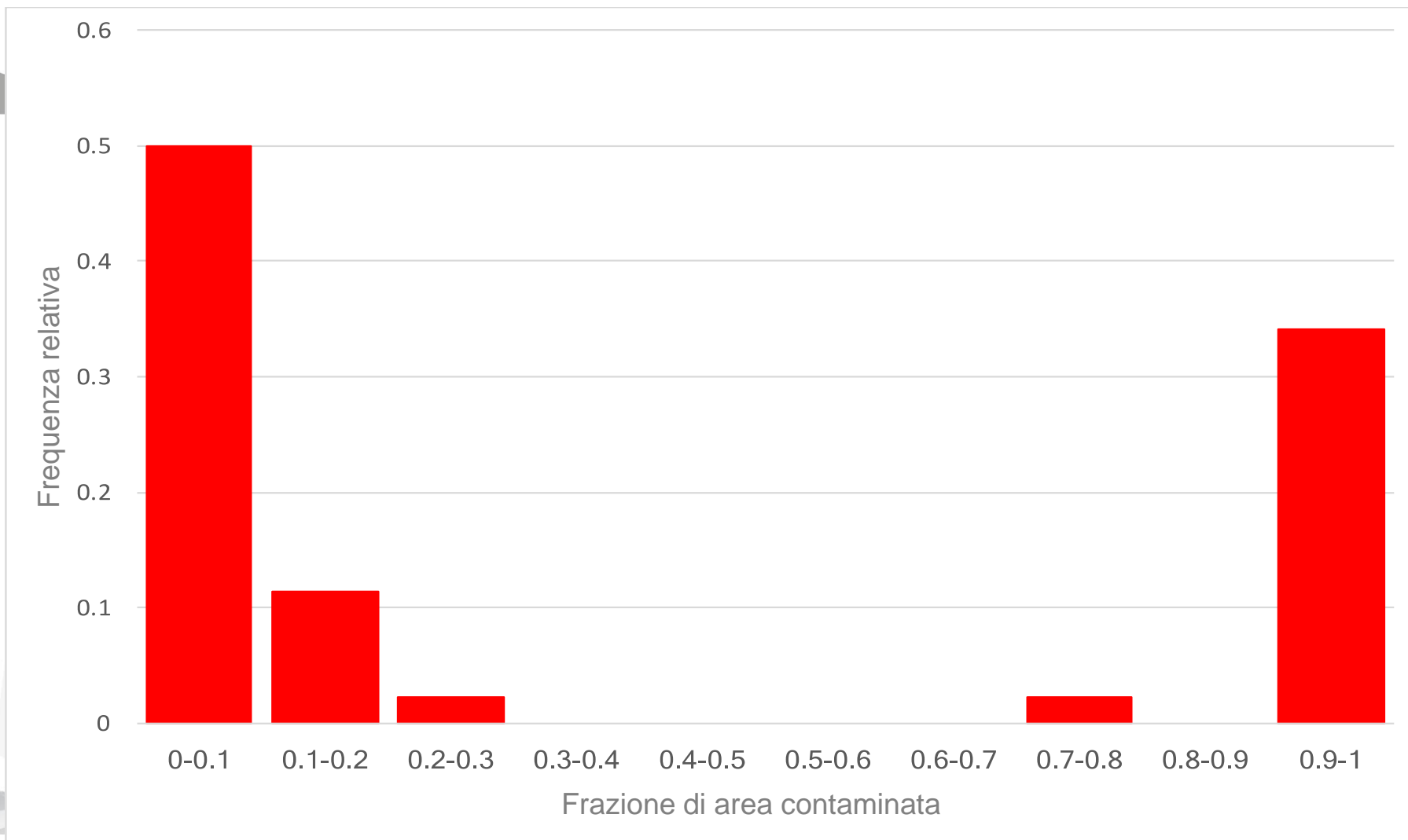


La distribuzione osservata è sovra-dispersa e la distribuzione della positività non segue un processo binomiale



## 2. Stimare l'entità della contaminazione superficiale della crosta

Frazione della superficie positiva in ogni 4° quarto suddiviso

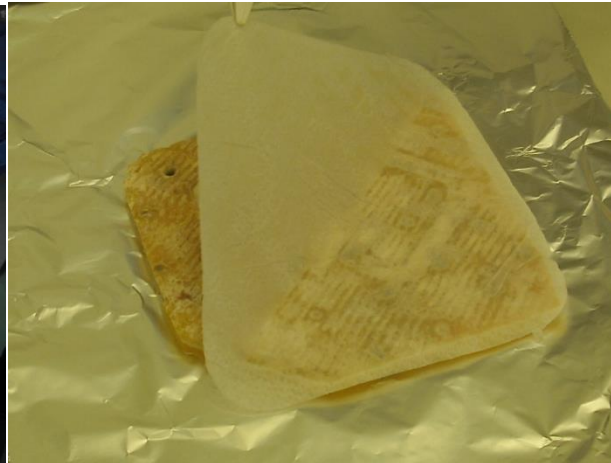


In 32 di 44 forme positive (72,7%), il 4° quarto aveva **almeno un quadrato positivo**

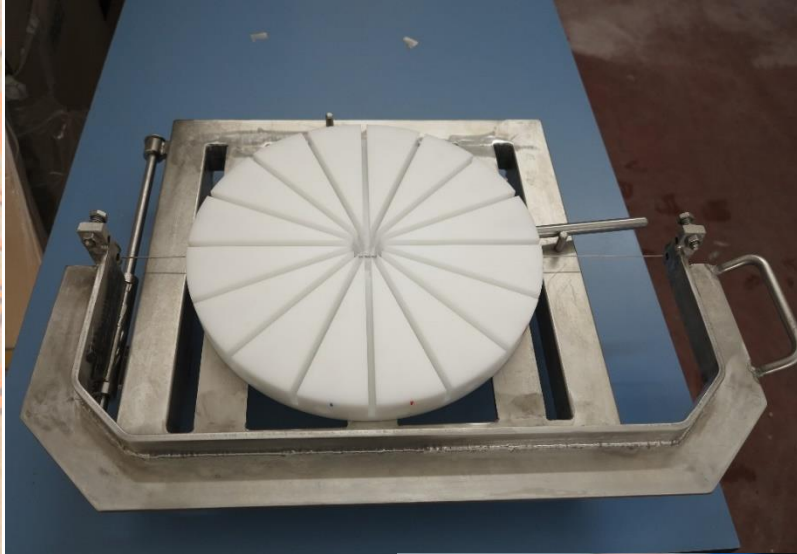
### 3. Valutare la frequenza e la quantità di trasferimento della contaminazione dalla crosta contaminata alla pasta durante l'affettatura

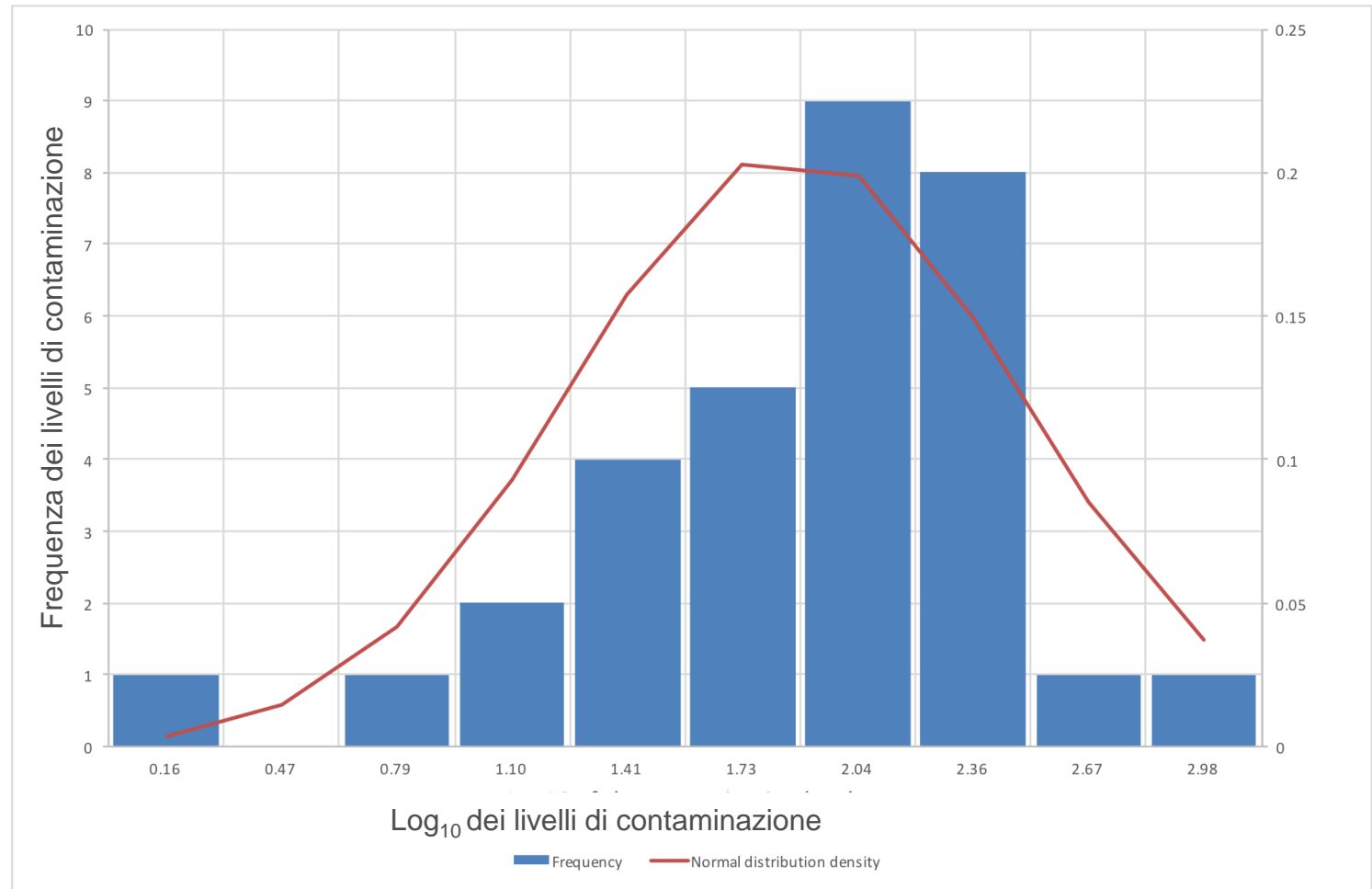
#### Contaminazione artificiale delle croste

1. Decontaminazione delle forme
2. Preparazione dell'inoculum
3. Standardizzazione
4. Contaminazione

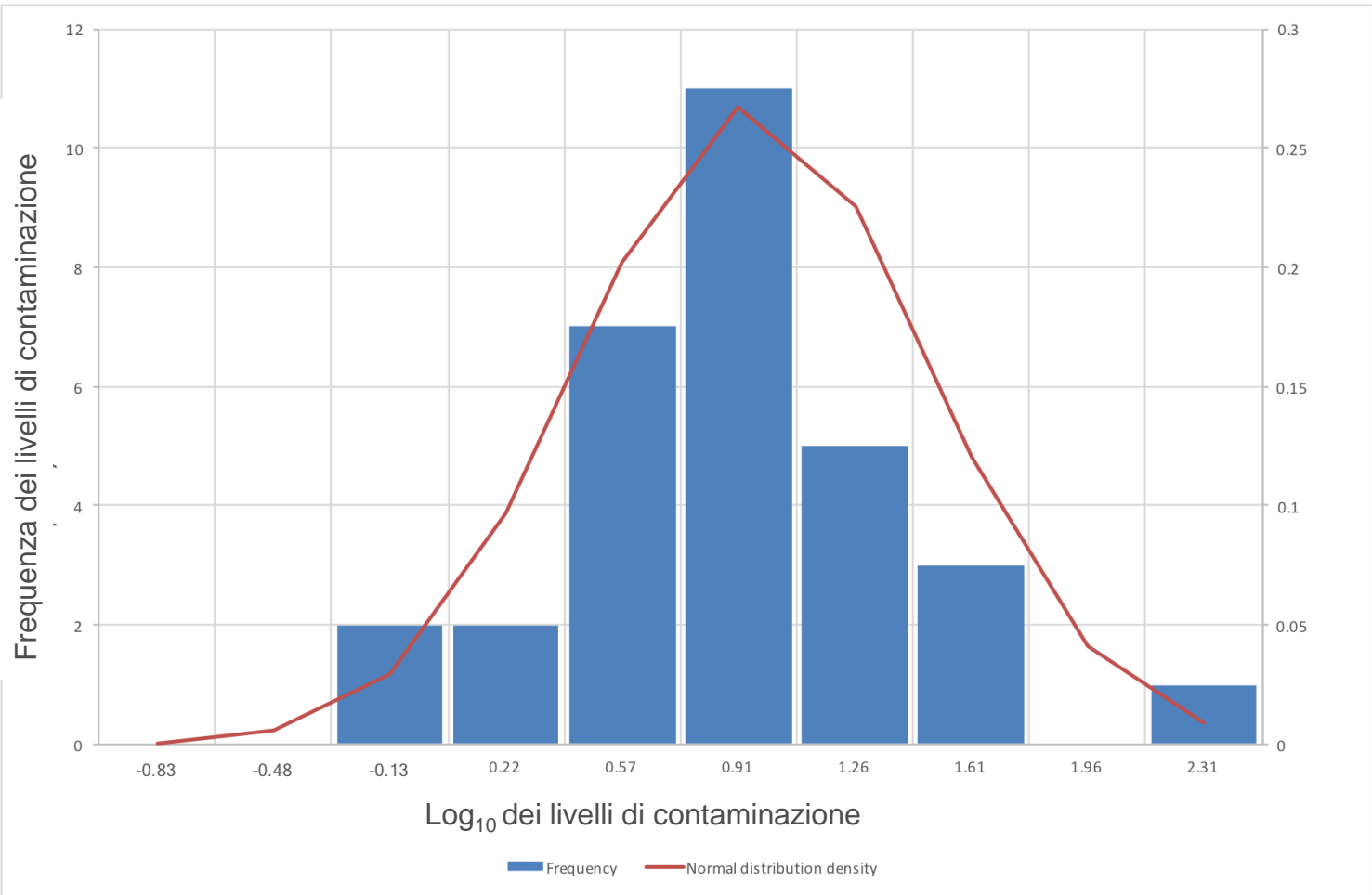


# Taglierina a filo






Distribuzione di frequenza dei livelli di contaminazione del filo, quando le croste sono state contaminate con il livello più alto di inoculo ( $\text{Log}_{10}=3,61$ )



Distribuzione di frequenza dei livelli di contaminazione della superficie di taglio, quando le croste sono state contaminate con il livello più alto di inoculo ( $\text{Log}_{10}=3,61$ )



Dato che ogni passaggio del filo attraverso la crosta contaminata raccoglie una certa quantità di cellule batteriche, abbiamo valutato se la contaminazione del filo e la quantità di contaminazione rilasciata sulla superficie di taglio della pasta aumentasse al numero di passaggi della taglierina.

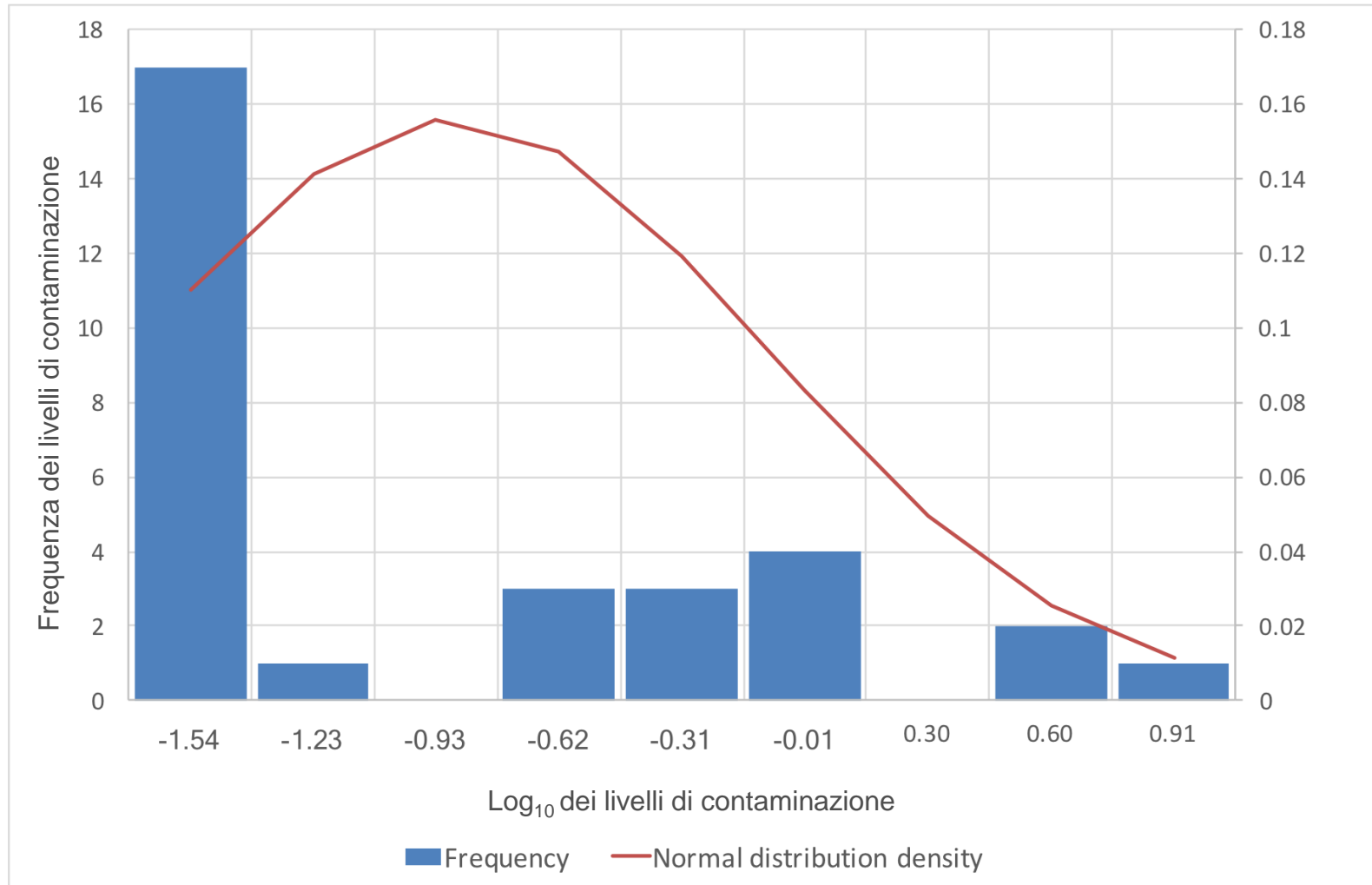
- Per ciascuno dei due livelli di contaminazione della crosta il livello di contaminazione del filo **non aumenta** all'aumentare del numero di tagli. Lo stesso vale per la contaminazione della superficie di taglio della pasta.



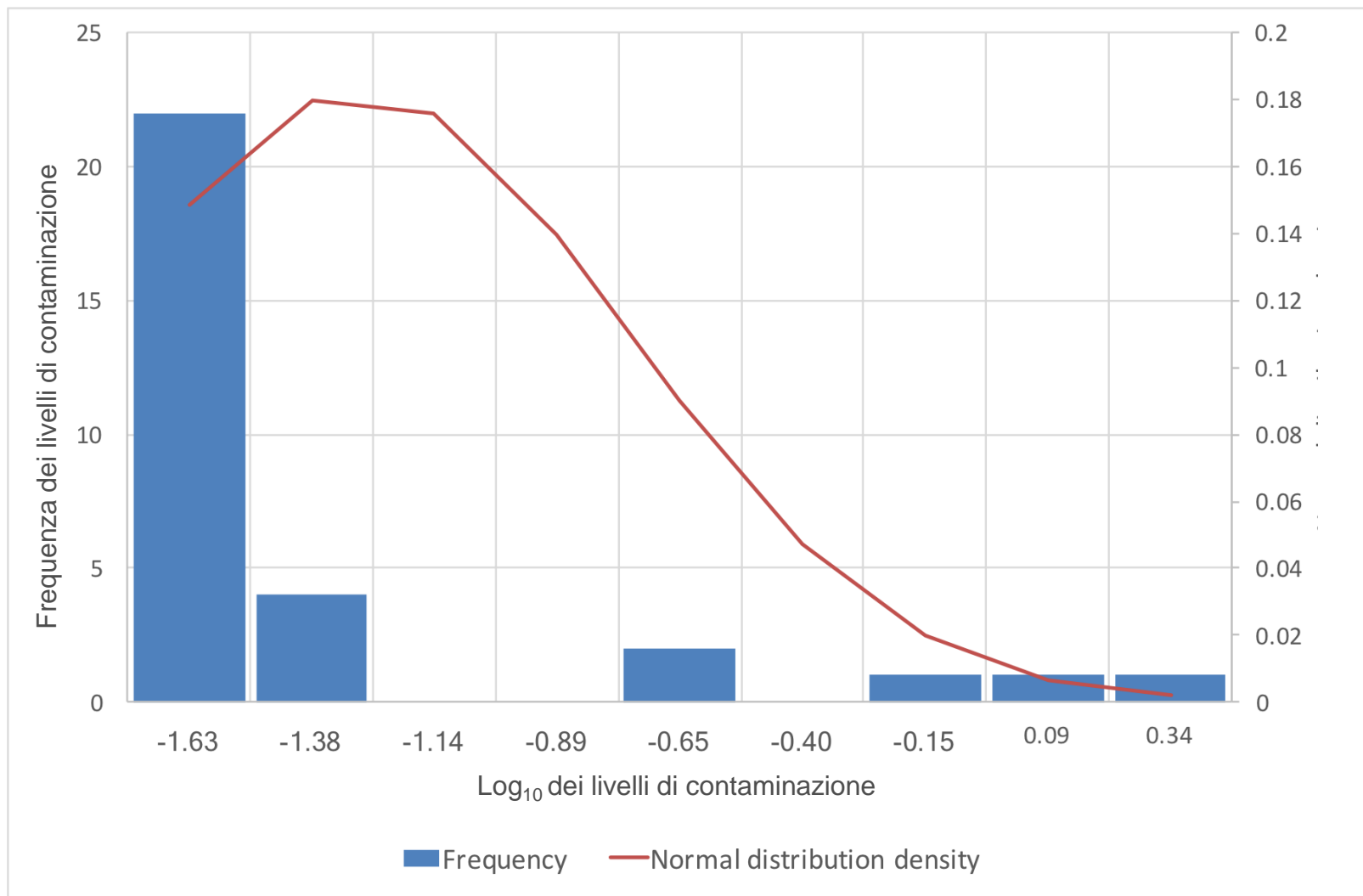


# Taglierina ad ultrasuoni





Distribuzione di frequenza dei livelli di contaminazione della superficie di taglio, quando le croste sono state contaminate con il livello più alto di inoculo ( $\text{Log}_{10}=4,23$ )




Distribuzione di frequenza dei livelli di contaminazione della superficie di taglio, quando le croste sono state contaminate con il livello più basso di inoculo ( $\text{Log}_{10}=3,25$ )

# Contaminazione attesa al dettaglio

- Complessivamente, **130** (46,43%) dei 280 quarti in cui sono state suddivise le 70 forme di formaggio hanno dato un risultato positivo.
- **Trentatre** 4° quarti (75%) delle 44 forme positive avevano almeno un quadrato positivo.
- Dei quadrati testati, **380** hanno dato un risultato positivo, vale a dire il 39,58% del numero totale testato
- Complessivamente, la contaminazione sulla superficie della crosta, può essere stimata intorno al 24,41% della superficie totale di tutte le croste di formaggio Gorgonzola al dettaglio (52,58% di superficie contaminata per quarto contaminato, nel 46,4%% dei quarti positivi).
- Quando si utilizza la taglierina a filo tutte le superfici tagliate risultano contaminate, mentre con quella ad ultrasuoni, il 58% o il 29% delle superfici tagliate risultano contaminate, a seconda della concentrazione iniziale di *Listeria* sulla crosta
- Possiamo stimare la frequenza attesa di contaminazione della pasta tra il 7 e il 14% delle fette a livello di vendita al dettaglio.



## 4. Stimare la curva di crescita di *Listeria monocytogenes* durante il periodo di conservazione del formaggio

- 
- I livelli di contaminazione dovuti alla diffusione della contaminazione superficiale durante il processo di taglio sono piuttosto bassi, specialmente con l'uso della taglierina ad ultrasuoni
  - In genere sono molto al di sotto delle 100 cellule batteriche/cm<sup>2</sup> (e, di conseguenza, inferiori a 100 cellule/g)

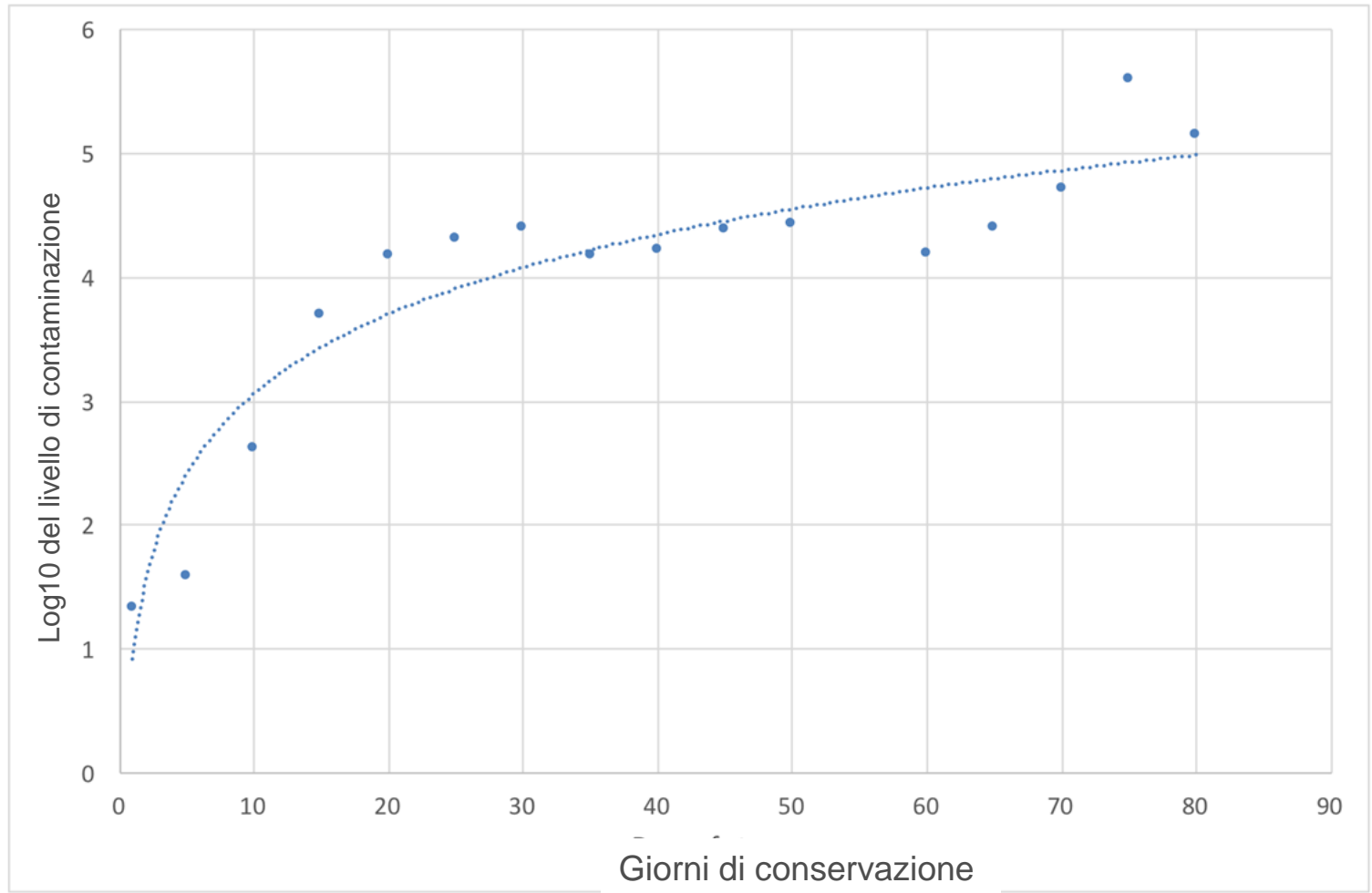
**La crescita durante la shelf life porta la contaminazione al di sopra della soglia UE?**



## 4. Stimare la curva di crescita di *Listeria monocytogenes* durante il periodo di conservazione del formaggio

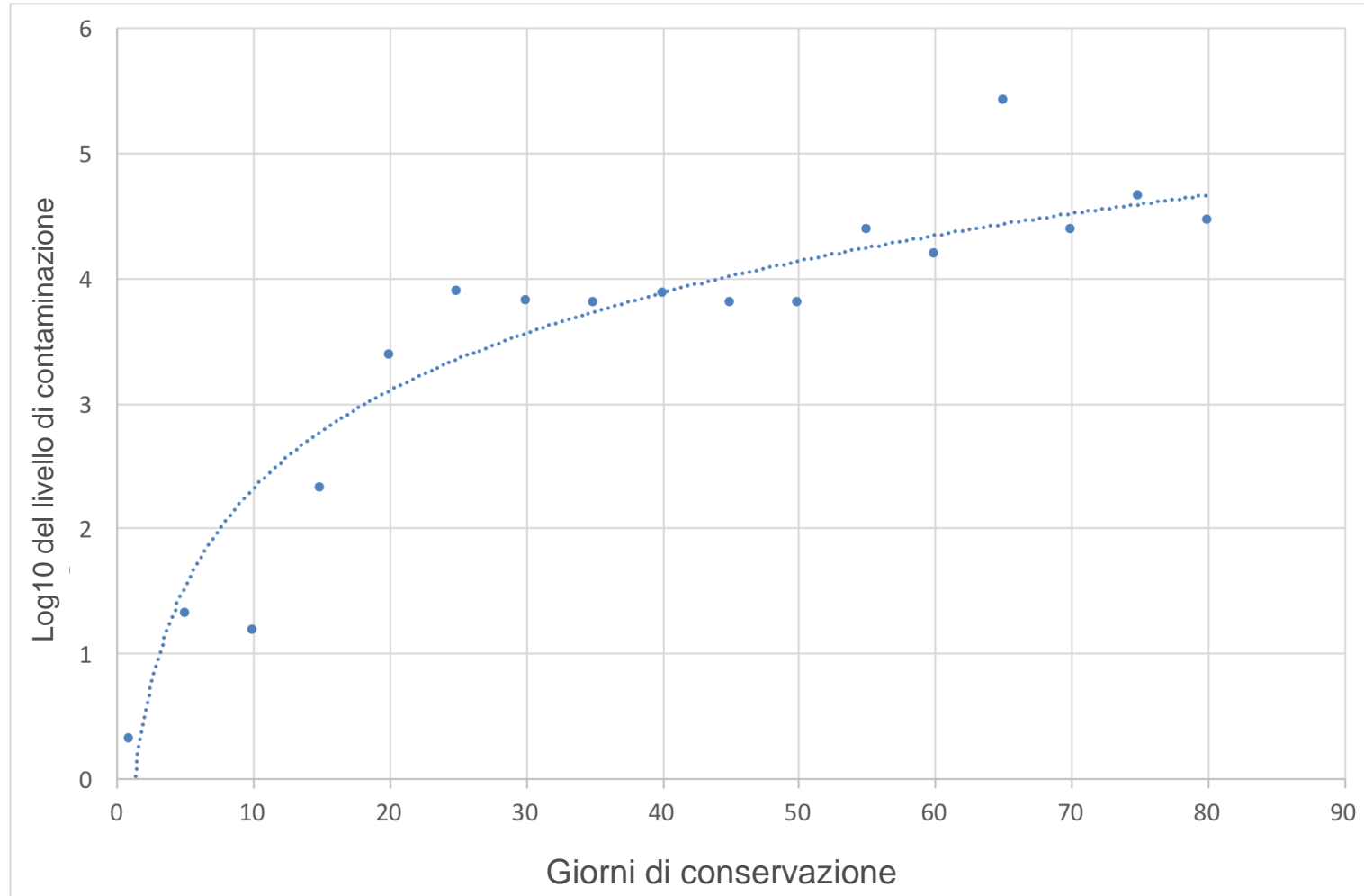


- L'inoculo è stato preparato seguendo la procedura già descritta per la contaminazione della crosta. Le concentrazioni delle sospensioni di inoculo erano 2,62 e 3,63 log<sub>10</sub> (cellule/ml).
- Le fette sono state mantenute nella loro confezione d'origine e ciascuna superficie di taglio è stata contaminata inoculandola con 1 ml di sospensione attraverso un setto di gomma adesivo che, dopo l'inoculazione, è stato coperto da un secondo setto per mantenere le stesse condizioni atmosferiche.
- Le unità testate sono state conservate a 12°C o a 8°C per 80 giorni.
- Le analisi sono state eseguite ogni cinque giorni dal giorno della contaminazione



Regressione logaritmica:  $y = 2,5959 \times \log_{10}(\text{giorni}) - 0,2702$ ;  $R^2 = 0,881$

Crescita batterica in seguito a conservazione a 12°C – Inoculum  $4,27 \times 10^3$  cellule batteriche/ml



Regressione logaritmica:  $y = 2,1329 \times \log_{10}(\text{giorni}) - 0,9293$ ;  $R^2 = 0,872$

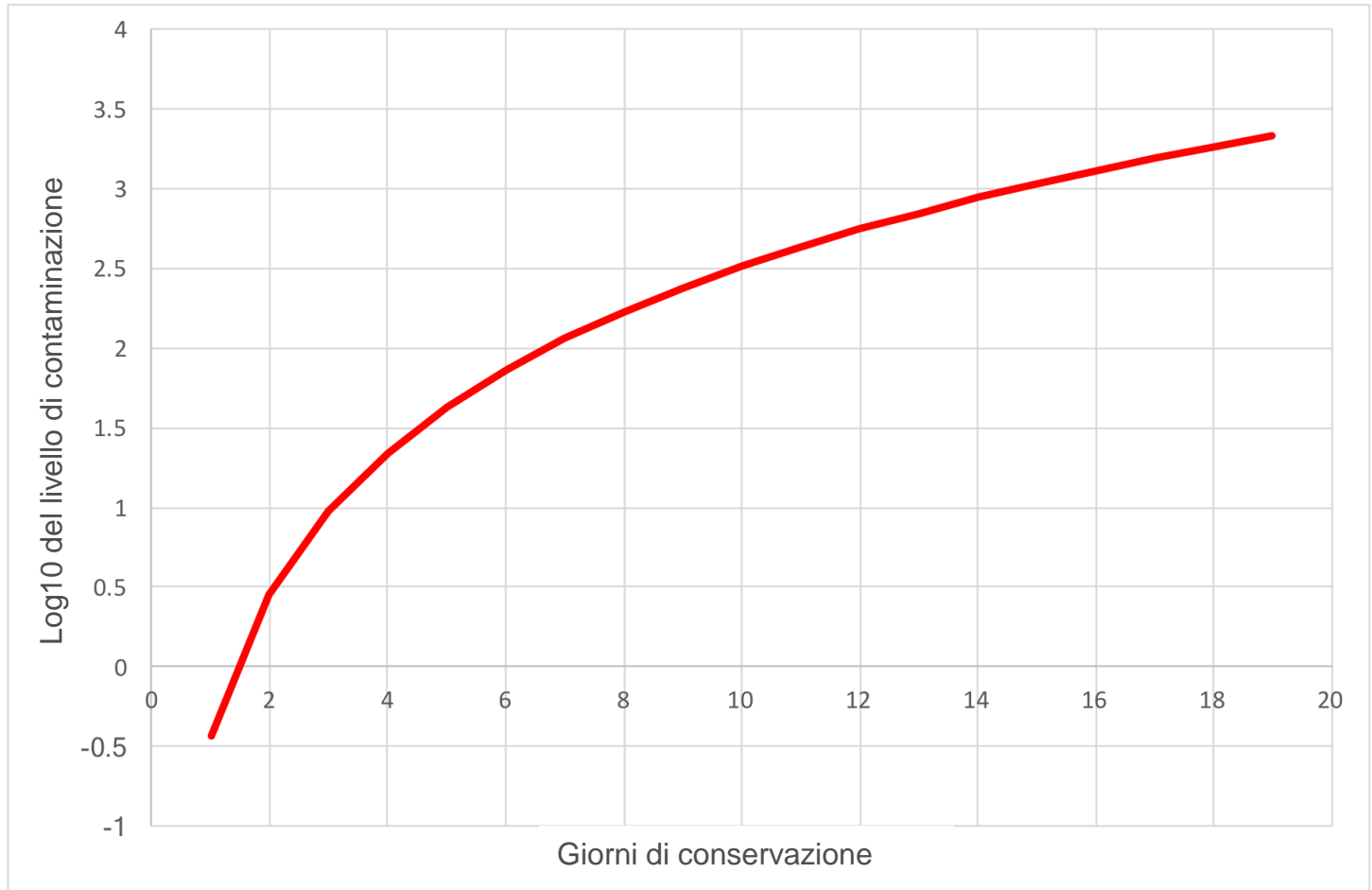
Crescita batterica in seguito a conservazione a 12°C – Inoculum  $4,17 \times 10^2$  cellule batteriche/ml



- La curva di crescita per la contaminazione iniziale prodotta utilizzando la taglierina ad ultrasuoni può essere stimata, considerando che un valore iniziale più basso della curva non influenza significativamente la pendenza della curva stessa durante la fase di crescita esponenziale (Baranyi and Roberts, 1994).
- La nuova curva, quindi, è data da una traslocazione della curva logaritmica di regressione per farla passare attraverso il valore iniziale della contaminazione prodotta dalla taglierina ad ultrasuoni.



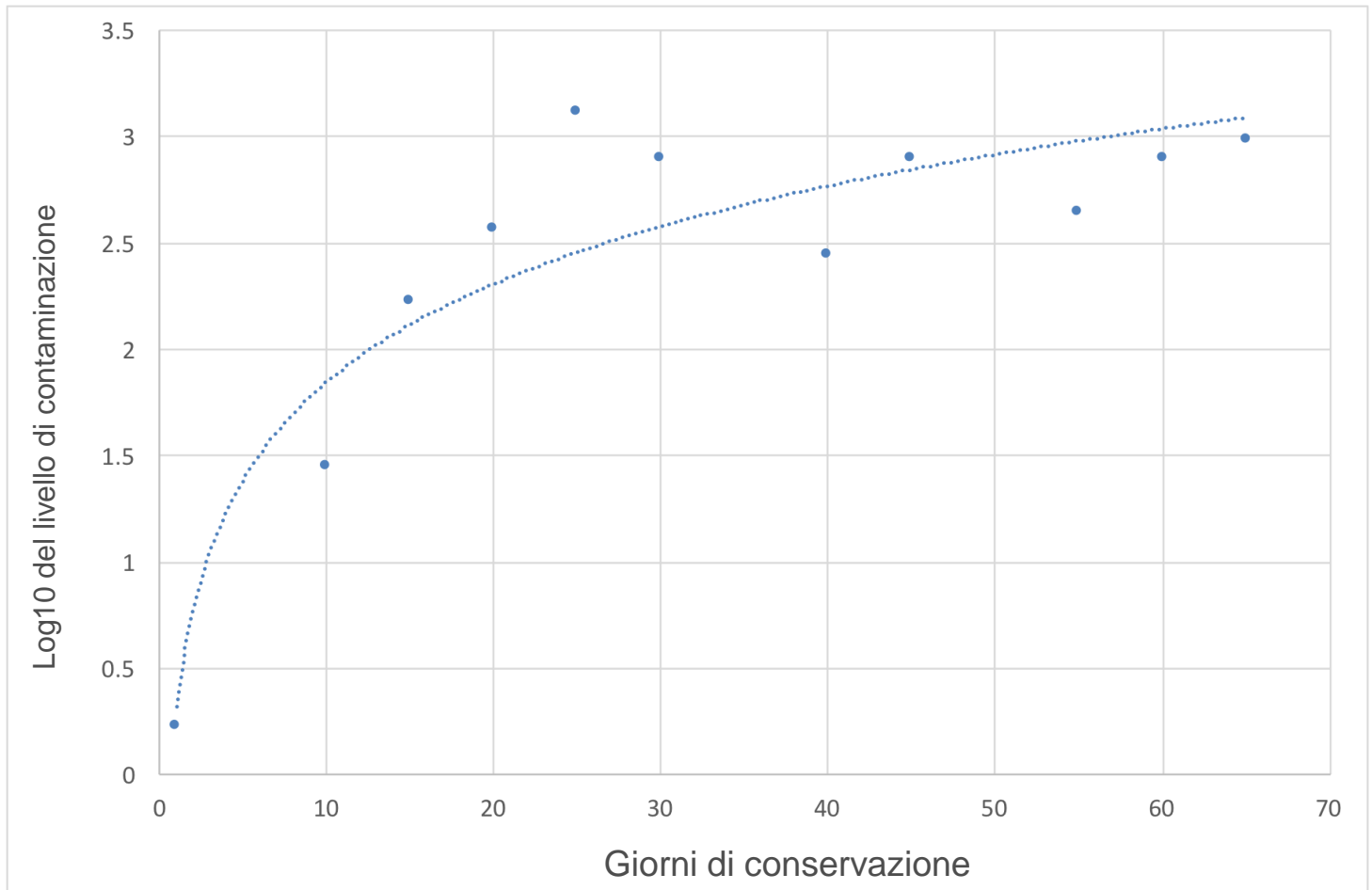
# Curva di crescita stimata



Regressione logaritmica:  $y = 2,2929 \times \log_{10}(\text{giorni}) - 0,43$

Crescita batterica stimata per la contaminazione da taglierina ad ultrasuoni in seguito a conservazione a 12°C






Regressione logaritmica:  $y = 0,6632 \times \log_{10}(\text{giorni}) - 0,3228$ ;  $R^2 = 0,860$

Crescita batterica in seguito a conservazione a 8°C – Inoculum  $6,76 \times 10^2$  cellule batteriche/ml

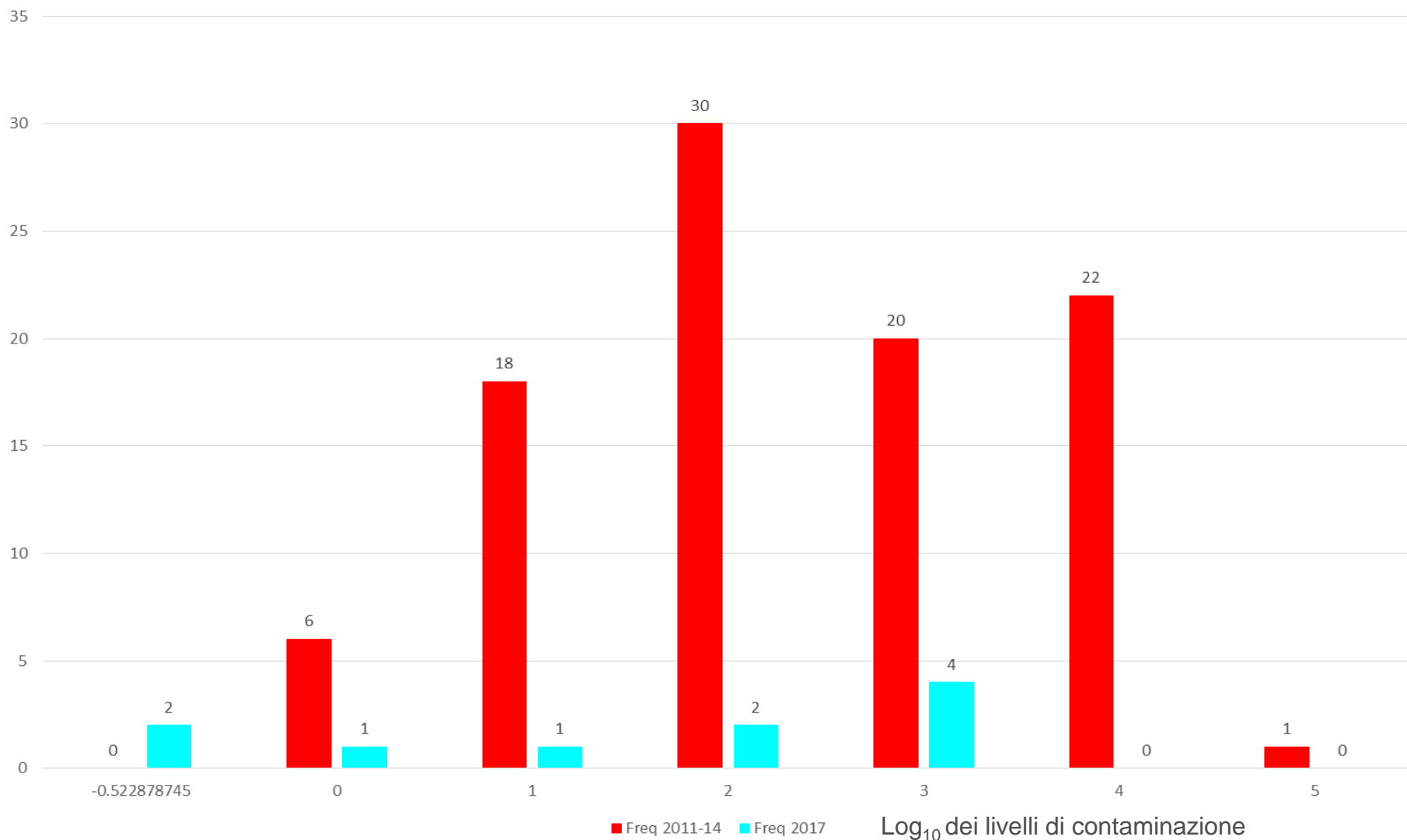
## 5. Valutare la frequenza di contaminazione della crosta in seguito alle misure di prevenzione adottate dalle aziende

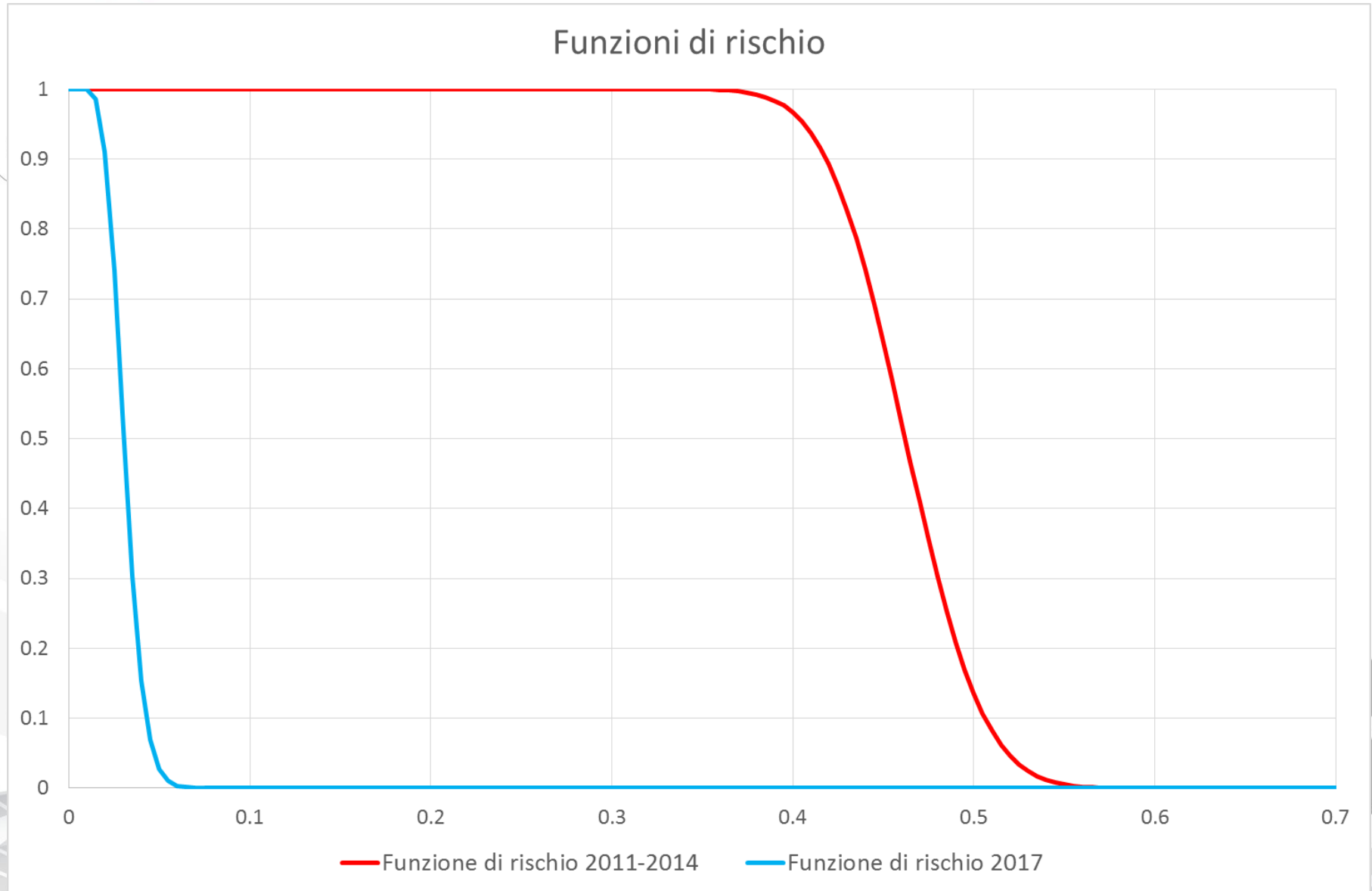
- 
- Sono state analizzate 36 croste di formaggio provenienti da 3 aziende diverse rappresentative del volume di produzione del consorzio.
  - Ciascuna crosta è stata suddivisa in 4 quarti e da ogni quarto sono stati effettuati 3 prelievi da 25 grammi ciascuno.
  - Sono state eseguite ricerca e numerazione per *Listeria monocytogenes*.
  - 11 campioni su 432 (2,54%) sono risultati positivi alla ricerca per *Listeria monocytogenes*.



Confronto frequenza di contaminazione

Numero di forme contaminate





# Grazie per l'attenzione!





# Ringraziamenti

Paolo Calistri

Gabriella Centorotola

Violeta Di Marzio

Armando Giovannini

Luigi Iannetti

Giacomo Migliorati

Diana Neri

Romina Romantini

Gino Angelo Santarelli

Annafranca Sperandii

Patrizia Tucci

