IZS SARDEGNA

Giornata di studio

Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes*

Contaminazione ambientale nelle aziende di produzione in Sardegna: latte e carne. Campionamento e risultati.

Teramo, 4 luglio 2019

Giovanni Terrosu
IZS Sardegna

La filiera lattiero casearia in Sardegna

IZS SARDEGNA

- 3.314.666 capi ovini
- 21.794 aziende ovine
- circa 3.000.000 q di latte ovino all'anno

Se pensiamo che **in Italia** nel 2016 del latte prodotto solo il **3,5% appartiene alla specie ovina** e che la **produzione totale** di latte corrisponde a **121.459.726 q** possiamo dire che **la Sardegna è di gran lunga la prima Regione Italiana per produzione di latte ovino.**

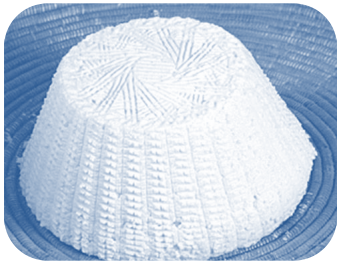
La filiera lattiero casearia in Sardegna

IZS SARDEGNA

- praticamente tutto il latte è destinato alla trasformazione
- formaggi (3 DOP)
- prodotti complementari
  - ricotta
  - yogurt

La filiera ovina sarda conserva ancora oggi, **malgrado l'innovazione** che ha investito i processi produttivi, molti aspetti che appartengono alla **tradizione**, sia per le **metodologie di allevamento** che per gli aspetti riguardanti la fase di **trasformazione**. Per questo motivo alcuni problemi che riguardano la sicurezza alimentare sono ancora attuali.

Prodotti e sicurezza alimentare



Product category	Date	Notification type	notification basis	Notified by	Subject
ces and desserts	03/03/2017	alert	official control on the market	Hungary	*Listeria monocytogenes* (310 CFU/g) in frozen ricotta and pears cakes from Italy
milk and milk products	08/09/2000	alert		Germany	*Listeria monocytogenes* in Cheese ricotta
milk and milk products	11/02/2005	alert	official control on the market	France	*Salmonella* (presence) in ricotta cheese from Italy
milk and milk products	20/03/2008	alert	food poisoning	Germany	*Listeria monocytogenes* (31000 CFU/g) in ricotta sheep's cheese from Italy
milk and milk products	27/03/2008	alert	official control on the market	Germany	*Listeria monocytogenes* (4700 CFU/g) in ricotta sheep's cheese from Italy
milk and milk products	01/04/2008	alert	official control on the market	Germany	*Listeria monocytogenes* (> 3,0 x 10E5 CFU/g) in salted ricotta sheep's cheese from Italy
milk and milk products	26/06/2008	alert	company's own check	Germany	*Listeria monocytogenes* (21300 CFU/g) in ricotta cheese from Italy
milk and milk products	09/07/2008	alert	company's own check	Germany	*Listeria monocytogenes* (1570 CFU/g) in ricotta cheese from Italy
milk and milk products	18/07/2008	information	official control on the market	France	*Listeria monocytogenes* (presence /25g) in ricotta sheep's cheese from Germany
milk and milk products	06/07/2010	alert	official control on the market	Italy	*Bacillus cereus* (27xE6 CFU/g) in ricotta from Italy
milk and milk products	17/09/2010	information	consumer complaint	Italy	altered organoleptic characteristics (scent and bad taste) of ricotta cheese from Italy
milk and milk products	03/10/2012	alert	official control in non-member country	Italy	*Listeria monocytogenes* (presence /25g) in ricotta cheese from Italy
milk and milk products	29/10/2012	information for attention	company's own check	Italy	*Listeria monocytogenes* (presence /25g) in chilled ricotta cheese from Italy
milk and milk products	18/07/2014	information for attention	official control on the market	Italy	*Bacillus cereus* (22000 CFU/g) in chilled ricotta from Italy

IZS SA 03/15 RC - obiettivi

Ricerca e caratterizzazione di nuove varianti patogene di microrganismi del genere Salmonella e Listeria in matrici alimentari e ambienti di produzione mediante tecniche di epidemiologia molecolare e studi di microbiologia predittiva

- **acquisizione di dati epidemiologici** aggiornati sulla presenza e sul livello di contaminazione da *Listeria spp* (con particolare riferimento a *L.monocytogenes* e varianti patogene di *L.innocua e L.ivanovii*) e studio del fenomeno della persistenza batterica in prodotti carnei e lattiero-caseari prodotti e commercializzati nella Regione Sardegna e relativi ambienti di produzione;

- **caratterizzazione** delle varianti patogene di *Listeria* nei prodotti presi in esame

IZS SARDEGNA

Listeria spp.

IZS SARDEGNA

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Journal of Clinical Microbiology

Fatal Case of *Listeria innocua* Bacteremia

Monique Perrin[1,*], Michel Bemer[2] and Catherine Delamare[1]

PubMed.gov
US National Library of Medicine
National Institutes of Health

Display Settings: Abstract

Science. 2001 Oct 26;294(5543):849-52.

Comparative genomics of Listeria species.

Glaser P[1], Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F, Berche P, Bloecker H, Brandt P, Chakraborty T, Charbit A, Chetouani F, Couvé E, de Daruvar A, Dehoux P, Domann E, Domínguez-Bernal G, Duchaud E, Durant L, Dussurget O, Entian KD, Fsihi H, García-del Portillo F, Garrido P, Gautier L, Goebel W, Gómez-López N, Hain T, Hauf J, Jackson D, Jones LM, Kaerst U, Kreft J, Kuhn M, Kunst F, Kurapkat G, Madueno E, Maitournam A, Vicente JM, Ng E, Nedjari H, Nordsiek G, Novella S, de Pablos B, Pérez-Diaz JC, Purcell R, Remmel B, Rose M, Schlueter T, Simoes N, Tierrez A, Vázquez-Boland JA, Voss H, Wehland J, Cossart P.

FEMS Pathogens and Disease

Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity

Carmen Buchrieser[1,*], Christophe Rusniok[1], The Listeria Consortium[1,†], Frank Kunst[1], Pascale Cossart[2] and Philippe Glaser[1]

Article first published online: 9 JAN 2006
DOI: 10.1016/S0928-8244(02)00448-0

Issue

FEMS Immunology & Medical Microbiology
Volume 35, Issue 3, pages 207–213, April 2003

ELSEVIER | Institut Pasteur

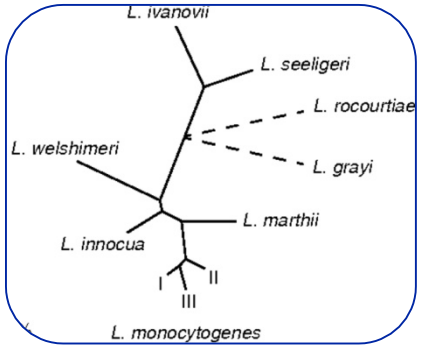
Research in Microbiology 163 (2012) 268–271
www.elsevier.com/locate/resmic

Characterization of atypical *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets

Luisa Zanolli Moreno [a,c], Renata Paixão [a], Debora Dirani Gobbi [a], Daniele Cristine Raimundo [a], Thais Porfida Ferreira [a], Ernesto Hofer [b], Maria Helena Matte [c], Andrea Micke Moreno [a,*]

Presenza dei geni di virulenza di *L. monocytogenes*:

- **Listeriolisina O (LLO)**
- **Internalina A (InlA)**
- **Internalina B (InlB)**



Listeria monocytogenes

IZS SARDEGNA

Patogeno ambientale

Nei locali di produzione con **valori di bassa temperatura ed alta umidità** si crea un ambiente ideale per la sopravvivenza e lo sviluppo, in particolare in **quelle superfici dove le operazioni di sanificazione sono più difficili** e c'è quindi la possibilità che si formino **biofilms**.

La **contaminazione post-pastorizzazione** è la principale fonte di *L. monocytogenes* nei prodotti lattiero-caseari.

Per questo motivo risulta di grande importanza un corretta applicazione delle **GMP** e di efficaci **operazioni di sanificazione**.

Listeria monocytogenes

CDC Home

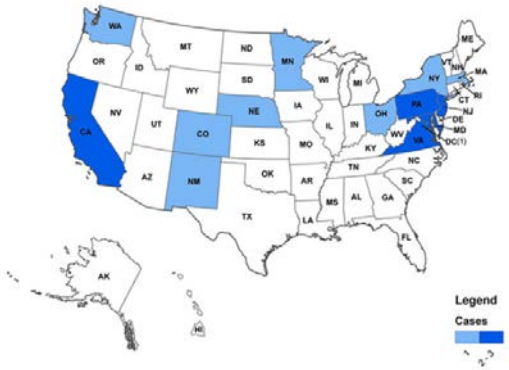
Centers for Disease Control and Prevention

CDC 24/7: Saving Lives. Protecting People.™

Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Imported Frescolina Marte Brand Ricotta Salata Cheese (Final Update)

Current Case Count Map

Persons infected with the outbreak-associated strain of *Listeria monocytogenes*, by state*



n= 22 for whom information was reported as of November 14, 2012

- Ricotte salate acquistate in Sardegna e riconfezionate in Puglia prima dell'esportazione negli USA
- 19 stati USA coinvolti tra il 20 giugno e il 9 agosto 2012
- 3 casi di morte (uno dubbio) e 19 ospedalizzazioni

- Il 31 agosto 2017 il Ministero della salute dirama un comunicato che invita i cittadini a non consumare la ricotta pecorina incriminata
- il prodotto era costituito da ricotte prodotte in caseifici sardi e acquistate da uno stabilimento che le trattava e riconfezionava, dandogli una nuova data di scadenza
- i casi di listeriosi erano riferiti a due donne ricoverate in rianimazione

IZS SA 03/15 RC - campionamento

IZS SARDEGNA

Nel periodo compreso tra **maggio e luglio del 2017** sono stati effettuati campionamenti in **n. 20 caseifici** tutti situati nel territorio della **Provincia di Sassari**, per totale sono stati analizzati **n. 320 campioni**

Tipologia Caseifici

- n. 12 industriali
- n. 8 minicaseifici

Tipologia campioni analizzati

- n. 248 campioni ambientali
- n. 64 di alimenti
- n. 8 di acqua

IZS SA 03/15 RC - campionamento

Il campionamento ambientale era effettuato utilizzando sponge su una superficie di circa 20 cm^2, il cui numero variava da un minimo di 7 a un massimo di 27 a secondo della **tipologia dello stabilimento** e della valutazione sullo **stato igienico dello stesso**.

Tipologia superfici campionate

- n. 112 superfici a contatto
  - n. 59 attrezzature
  - n. 29 carrelli
  - n.17 macchinari
  - n. 36 piani
- n. 136 superfici non a contatto
  - n. 39 pavimenti
  - n. 67 canalette
  - n.1 stivali

Alimenti

- n. 27 materie prime e prodotti intermedi
  - latte crudo
  - cagliata
  - salamoia
  - siero
  - panna
- n. 37 prodotto finito
  - n. 15 di formaggio
  - n. 22 di ricotta

IZS SA 03/15 RC - campionamento

Attrezzature (sponge)	Numero Campioni
Cella frigo	4
Fuscelle	16
Stampi	2
Filtri latte	1
Teli ricotta	1
Nastro trasportatore	8
Polivalenti	5
Vasca	2
Porzionatrice	4
Pressa	4
Strumenti vari	12

Macchinario (sponge)	Numero Campioni
Macchinari vari lavorazione	5
Stufatrice	1
Salatrice	1
Filatrice	2
Lavaformaggi	4
Sottovuoto	3
Confezionatrice	1

IZS SA 03/15 RC - campionamento

IZS SARDEGNA

Denominazione area (sponge pavimenti)	Numero Campioni
Locale lavorazione	24
Locale salatura	3
Locale stagionatura	6
Locale porzionatura e confezionamento	3
Locale ricevimento latte	2
Locale sosta/raffreddamento ricotta	1

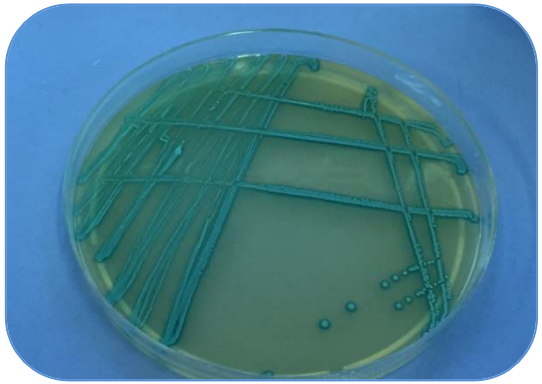
Denominazione area (sponge piani)	Numero Campioni
Locale lavorazione	6
Locale salatura	1
Locale stagionatura (piano legno)	12
Locale stagionatura	13
Locale porzionatura e confezionamento	4

Denominazione area (sponge canalette)	Numero Campioni
Locale lavorazione	33
Locale salatura	7
Locale stagionatura	9
Locale porzionatura e confezionamento	8
Locale ricevimento latte	4
Corridoio	1

IZS SA 03/15 RC - analisi

IZS SARDEGNA

Campioni



Ricerca colturale secondo il metodo **ISO 11290-1:2017** *"Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp. - Part 1: Detection method".*

Da ogni piastra in cui venivano riscontrate **colonie tipiche**, presumibilmente appartenenti al genere *Listeria*, venivano selezionate, ove possibile, almeno 5 colonie.

PCR multiplex

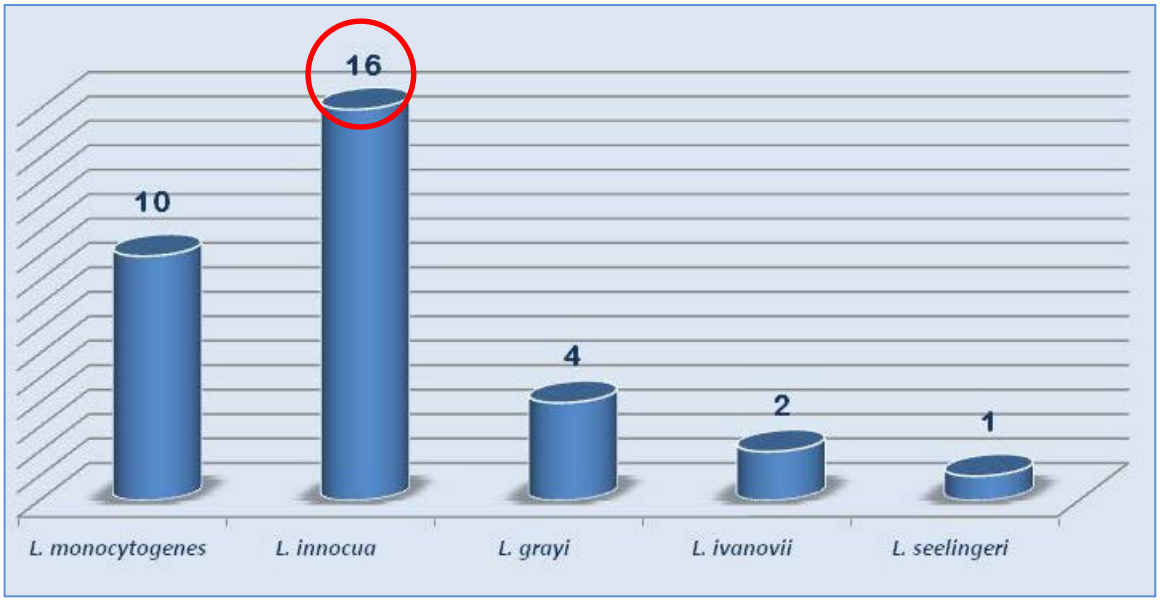
Il protocollo di PCR multiplex è stato messo a punto utilizzando i primers descritti da *J. Ryu et al. (2013)* e modificando il protocollo stesso. Questo protocollo ha lo scopo di individuare le sei specie di *Listeria* ***(L. monocytogenes, L. innocua, L. ivanovii, L. grayi, L. seeligeri e L. welshimeri).***

IZS SA 03/15 RC - risultati

Sono risultati **positivi a *Listeria spp.*** n. 28 campioni:

- n. 6 campioni per *L. monocytogenes*
- n. 17 per un altra specie
- n. 4 per più specie.

Specie	n. +
L. monocytogenes	6
L. innocua	13
L. grayi	3
L. ivanovii	2
L. monocytogenes *L. innocua*	2
L. monocytogenes *L. Innocua* *L. seelingeri*	1
L. monocytogenes *L. grayi*	1



IZS SA 03/15 RC - risultati

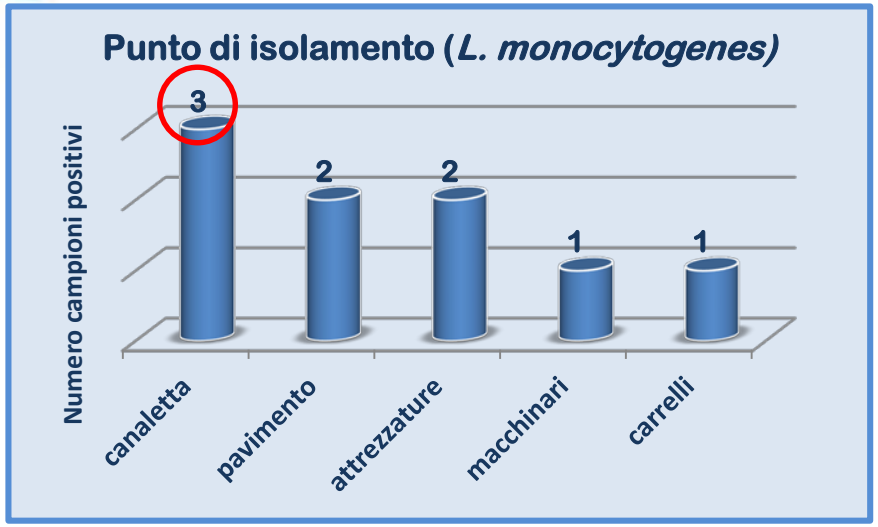
Sono risultati **positivi a *Listeria spp.*** n. 9 stabilimenti (45%):

- n. 3 appartenevano alla tipologia artigianale
- n. 6 appartenevano alla tipologia industriale

In n. 3 stabilimenti è stata riscontrato solo un campione positivo

Lo stabilimento con il maggior numero di isolamenti presentava n. 7 campioni positivi

IZS SA 03/15 RC - risultati



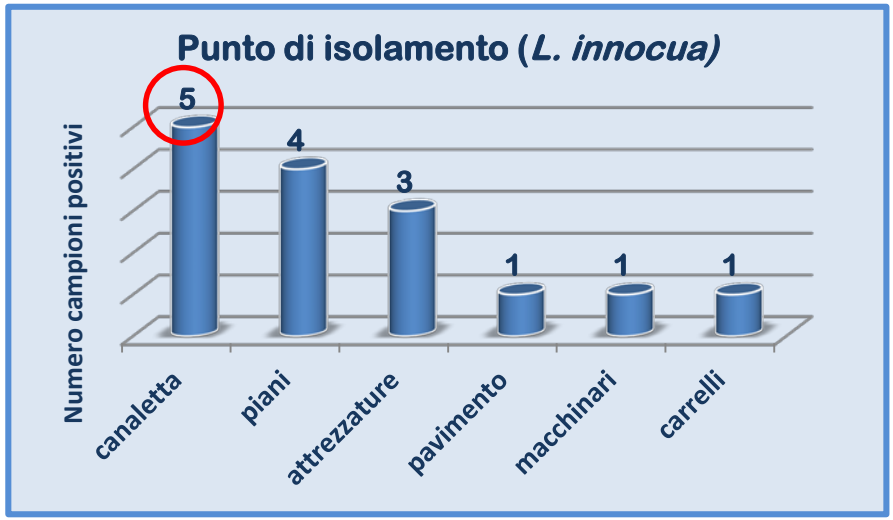
L. gray è stata riscontrata in n. 4 campioni:

- macchina lava formaggi
- polivalente
- fuscelle
- canaletta del locale ricevimento

L. ivanovii è stata isolata da:

- formaggio
- piano in legno del locale stagionatura

In un campione prelevato in una **canaletta** sono state isolate tre diverse specie di *Listeria:* ***L. monocytogenes, L. innocua e L. seelingeri.***



IZS SA 03/15 RC - conclusioni

IZS SARDEGNA

- La percentuale di caseifici in cui è stato rilevato almeno un campione positivo rispecchia i risultati ottenuti in altre ricerche;
- nei 2/3 dei caseifici positivi *Listeria spp.* è stata rilevata in più ambienti. Questo microrganismo si riscontra in particolare in quelle aree dei caseifici, in cui tende a permanere umidità e che siano difficili da sanificare, e in cui di conseguenza può formare biofilms, **una volta entrato nello stabilimento, risulta difficile controllarne la diffusione in tutti gli ambienti**;
- **a differenza degli ambienti**, che i dati hanno rivelato essere spesso contaminati, è risultato raro il riscontro di positività negli alimenti;
- riscontro di positività nella salamoia;
- tutti i campioni di acqua sono risultati negativi;
- malgrado i campioni sul latte crudo hanno sempre dato esito negativo, le positività riscontrate nelle zone ricevimento di due diversi stabilimenti indicano che **una delle possibili vie di introduzione di *Listeria*** potrebbe essere proprio questa area, alla quale spesso accede anche personale esterno;

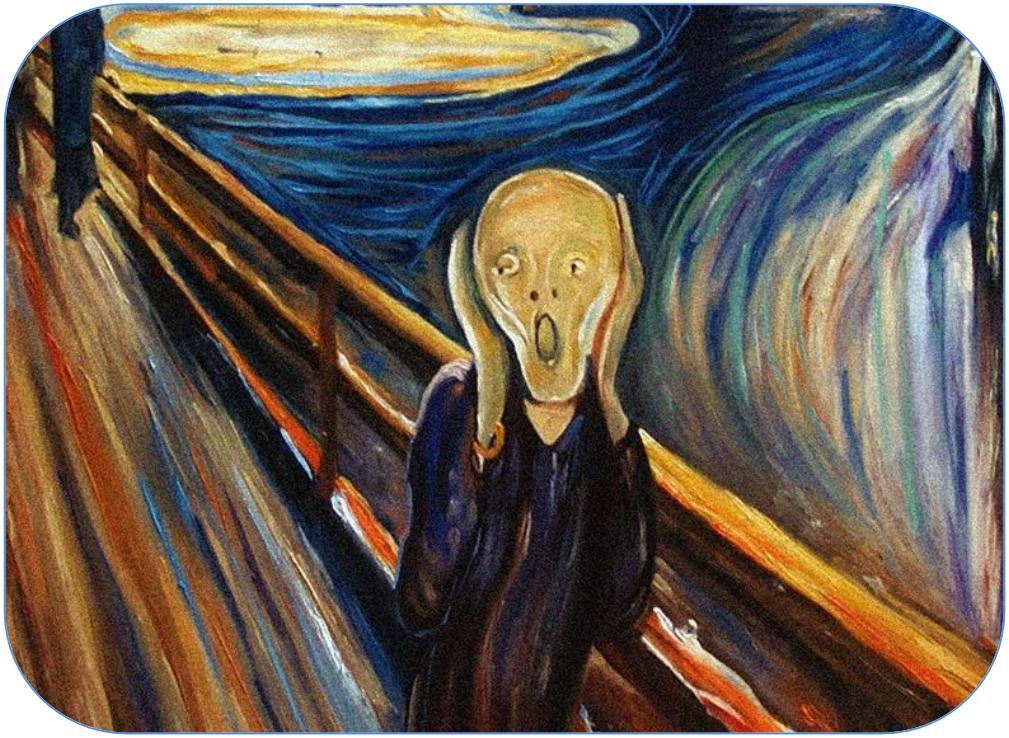
IZS SA 03/15 RC - conclusioni

IZS SARDEGNA

- le diverse specie di *Listeria* sembrano condividere lo stesso habitat. Infatti in diversi casi dallo stesso campione sono state isolati ceppi appartenenti a diverse specie. Unico caso particolare quello dei piani di stagionatura dove è stata isolata prevalentemente *L. innocua*;
- una elevata prevalenza viene riscontrata, come era prevedibile, nelle canalette di diverse aree di lavorazione del prodotto;
- tra le superfici che vengono a contatto con l'alimento sono state riscontrate positività sia nelle attrezzature che nei macchinari. In particolare fuscelle ed altre attrezzature utilizzate per la produzione della ricotta, una polivalente, nastri trasportatori e le spazzole dei macchinari utilizzati per la pulitura superficiale del prodotto;
- in conclusione, malgrado non siano stati rilevati campioni positivi per *L. monocytogenes* negli alimenti campionati nell'ambito della ricerca, le rilevanti prevalenze di *Listeria spp.* negli stabilimenti lattiero-caseari, suggeriscono la necessità di programmare campionamenti ambientali per la ricerca di *L. monocytogenes*.

Grazie per l'attenzione

IZS SARDEGNA



ma non finisce qui…….