



ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Studio della contaminazione ambientale e di prodotto in aziende produttrici di gorgonzola

Vicdalia Aniela Acciari

LNR per *Listeria monocytogenes*

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell' Abruzzo e del Molise "G. Caporale"

Teramo - Italy



Indice della presentazione

- **Obiettivi dello studio**
- **Studio sperimentale:**
 - Contaminazione ambientale
 - Contaminazione prodotti
 - Caratterizzazione fenotipica e genotipica dei ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati
- **Risultati**
- **Valutazione dei risultati**
- **Conclusioni**



CONTAMINAZIONE AMBIENTALE

Valutare la prevalenza di contaminazione da *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. negli ambienti di lavorazione di due aziende produttrici di gorgonzola



Sono stati programmati quattro campionamenti in un periodo di 12 mesi



Prelievo di tamponi ambientali nelle principali aree di lavorazione :

- ✓ **Area di caseificazione**
- ✓ **Area dei salatura**
- ✓ **Area di stagionatura**
- ✓ **Area di taglio e confezionamento**

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

Nel secondo campionamento prelievi in un'ulteriore area (Area spogliatoio del personale) per valutare il ruolo della movimentazione degli operatori



Valutazione della contaminazione ambientale **CAMPIONAMENTO**

PUNTI DI PRELIEVO

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

MODALITA' di CAMPIONAMENTO

- ✓ spugnette



Studio sperimentale **CONTAMINAZIONE DEL PRODOTTO**

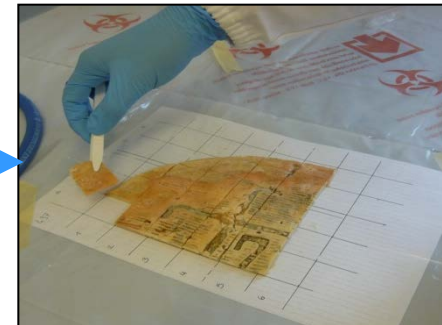
Valutare la prevalenza ed i livelli di contaminazione da *L. monocytogenes* dalla CROSTA e dalla PASTA del prodotto finito

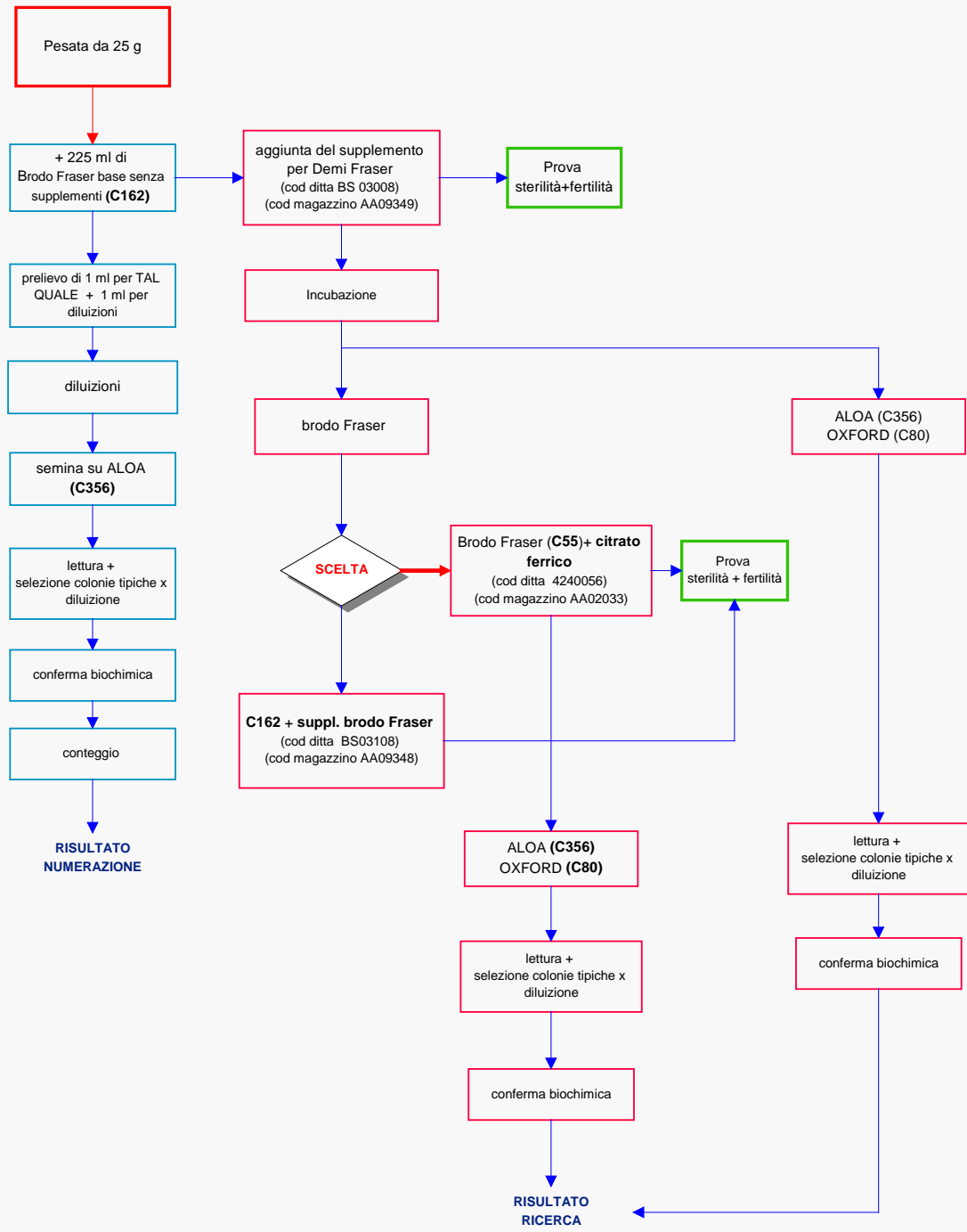
5 forme di prodotto finito da ognuno dei 5 lotti di produzione selezionati

- **Livelli di contaminazione dalla crosta e dalla pasta**
- **Distribuzione e densità di contaminazione sulla crosta**



Studio sperimentale CONTAMINAZIONE DEL PRODOTTO





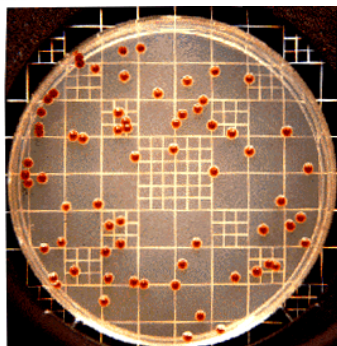
Studio sperimentale **Caratterizzazione fenotipica e genotipica dei ceppi di** ***L. monocytogenes* isolati**

Valutare la prevalenza di determinati ceppi di *L. monocytogenes* al interno degli stabilimenti di produzione e a livello del prodotto finito

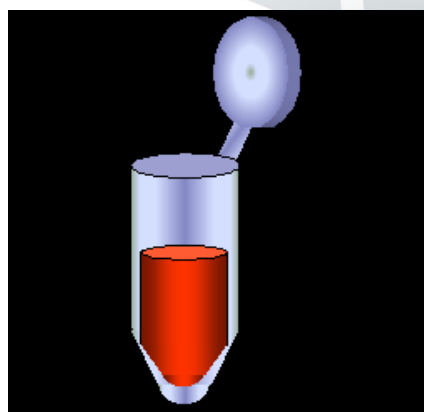


- **Identificazione sierologica**
- **Analisi di macrorestrizione con gli enzimi *AscI* e *ApaI* mediante Elettroforesi in campo pulsato (PFGE)**

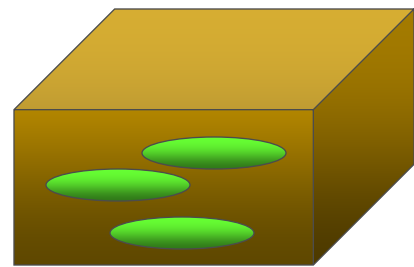




Serratia marcescens
Trypticase soy (TSA) agar



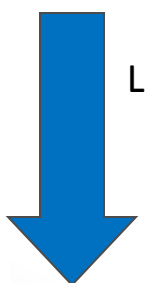
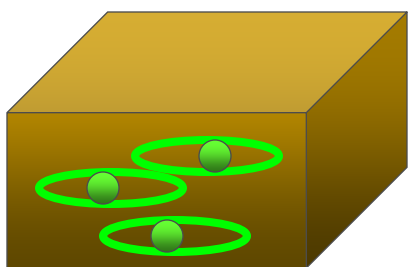
+ AGAROSIO



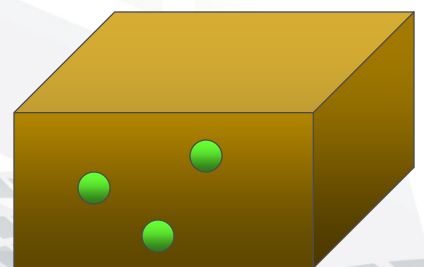
Cellule inglobate



Incubazione con
proteinase K

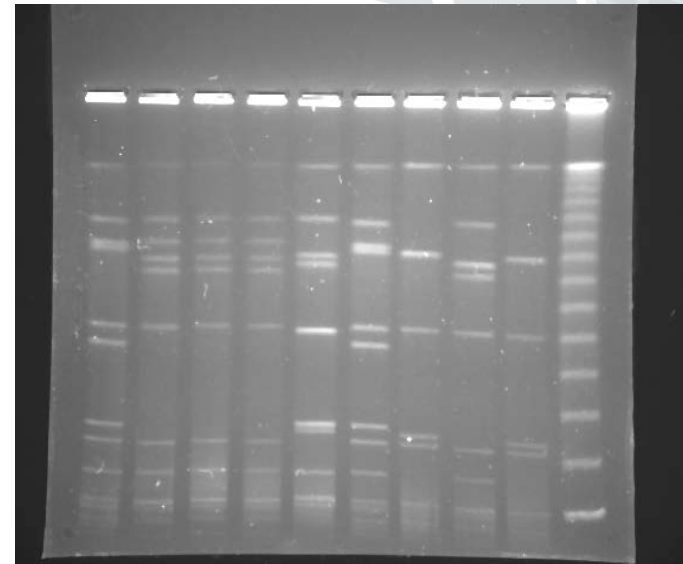
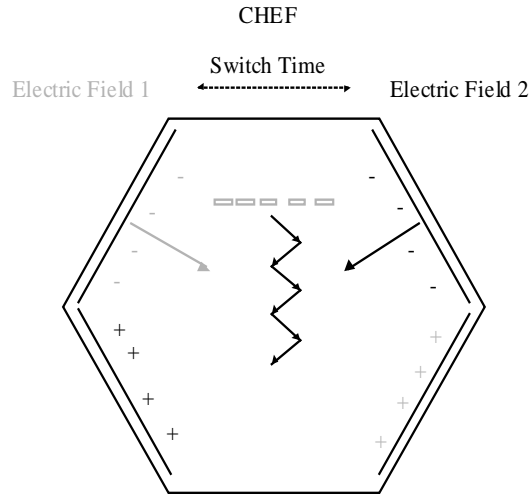


Lisi cellulare e lavaggi per eliminare i
detriti cellulari

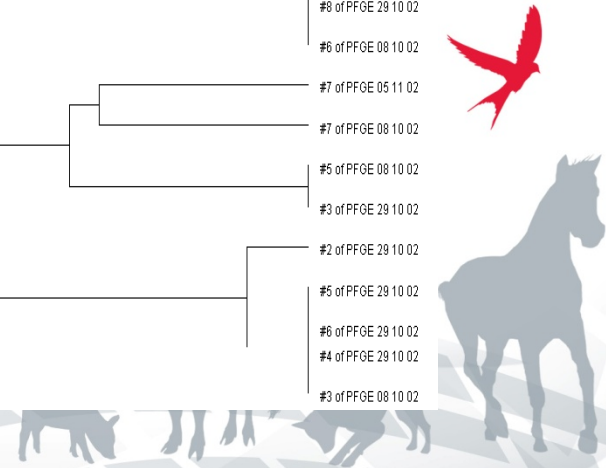
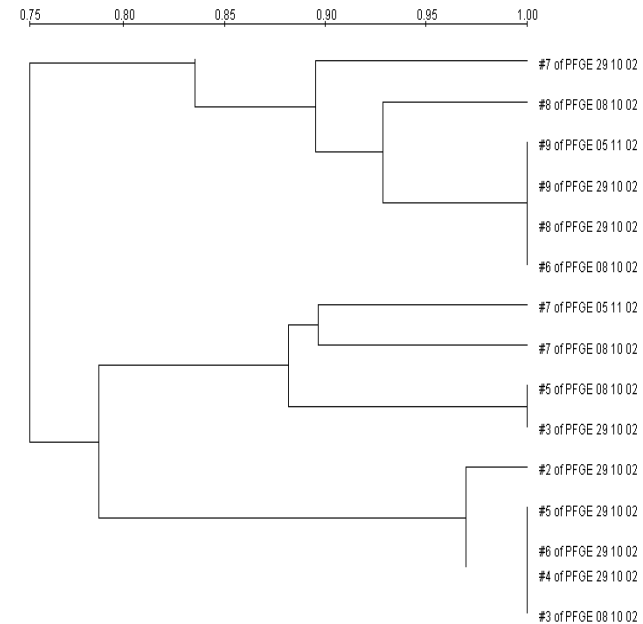


Digestione con enzima di
restrizione





Analisi delle immagini con il software Bionumerics versione 6.6



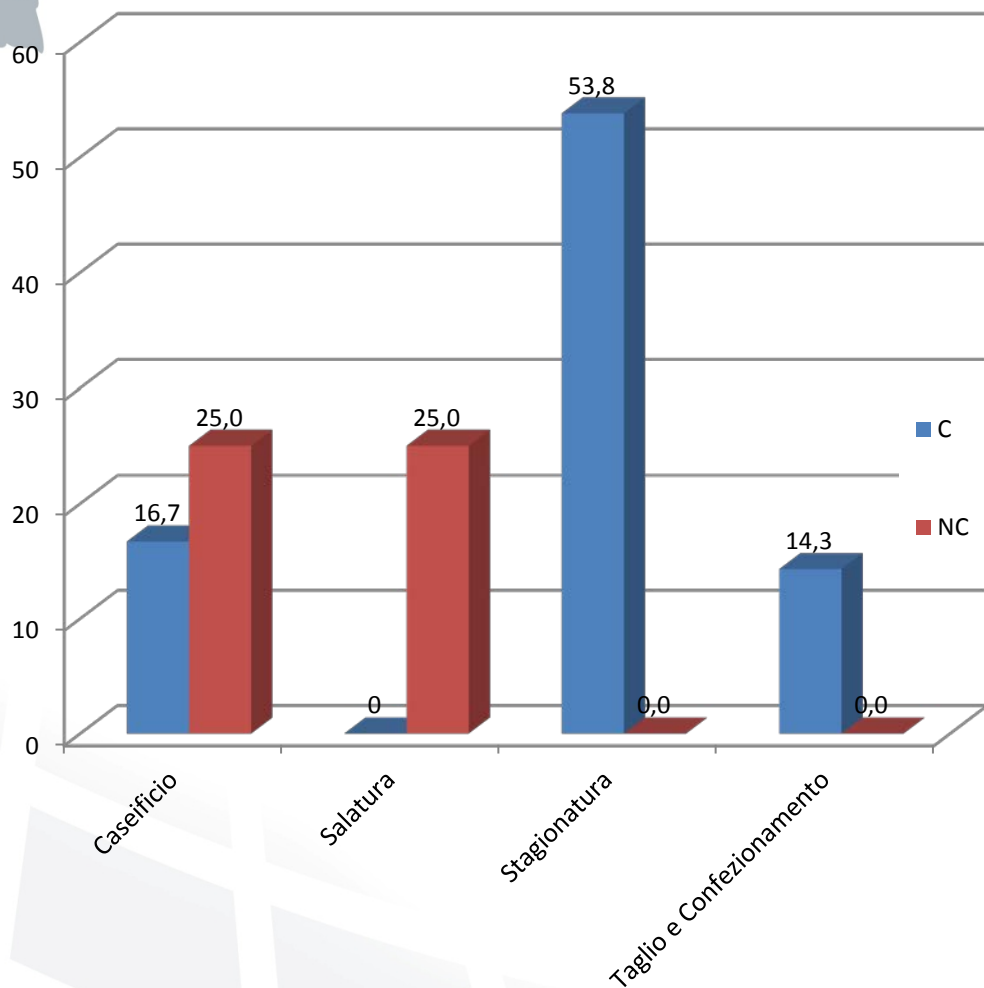


RISULTATI

Azienda 1



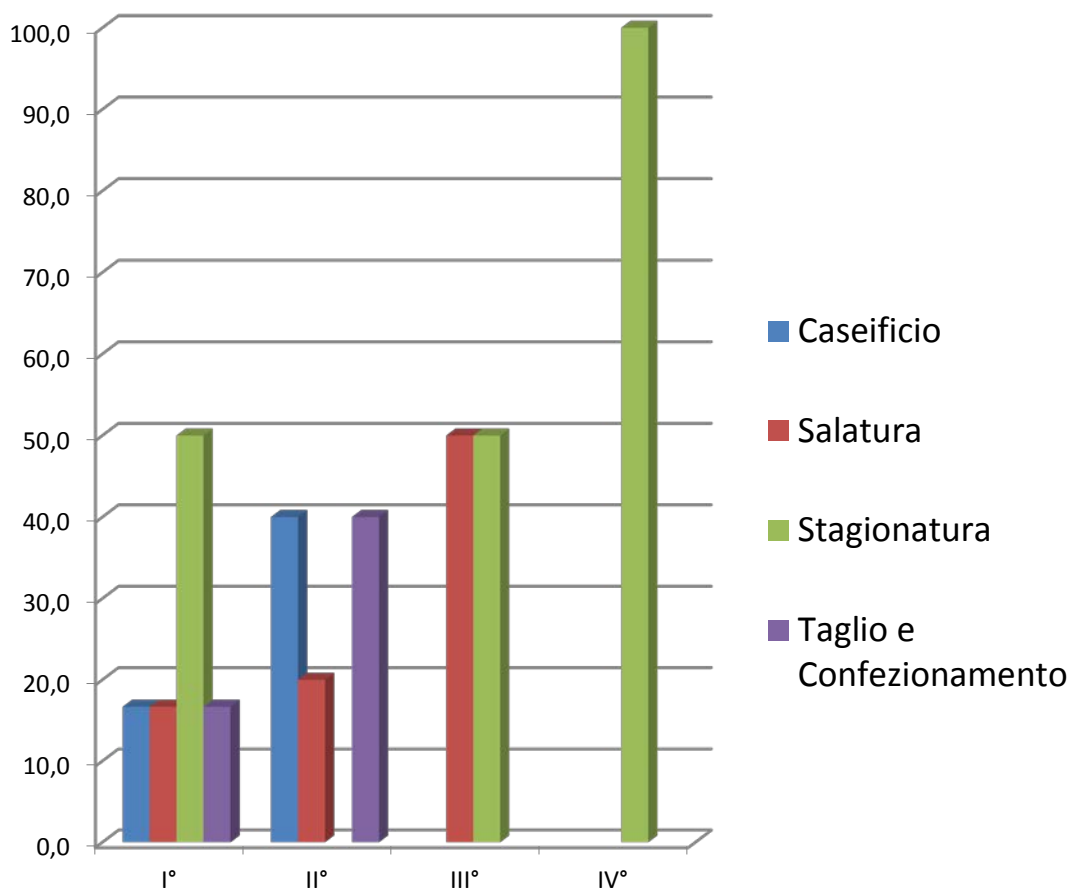
Valutazione della contaminazione ambientale



- Sono stati analizzati 80 campioni ambientali di cui 58 superfici a **contatto** e 22 **non a contatto**.
- Il 20% delle superficie a **contatto** e il 18% delle **non a contatto** sono risultate contaminate da *Listeria monocytogenes*
- *Listeria spp.* è stata rilevata in 13 campioni ambientali (16 %) 1 acqua di scarico.



Valutazione della contaminazione ambientale



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

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

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

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



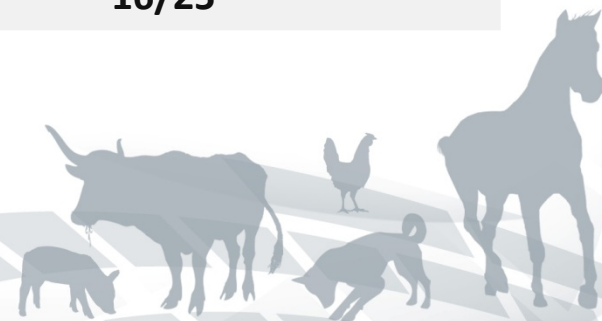
Valutazione della contaminazione del prodotto

- ✓ Sono state analizzate 25 mezze 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 è emerso che 16 mezze forme (64%) erano positive.



Risultati della analisi qualitative su crosta e pasta

| Lotti di produzione | Numero di campioni positivi alla ricerca di <i>L. monocytogenes</i> /numero di campioni esaminati | | Numero di mezze forme positive alla ricerca di <i>L. monocytogenes</i> /numero mezze esaminati |
|---------------------|---|--------------|--|
| | <i>Crosta</i> | <i>pasta</i> | <i>Mezze forme</i> |
| 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 |



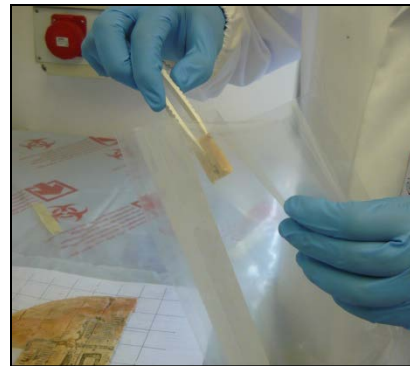
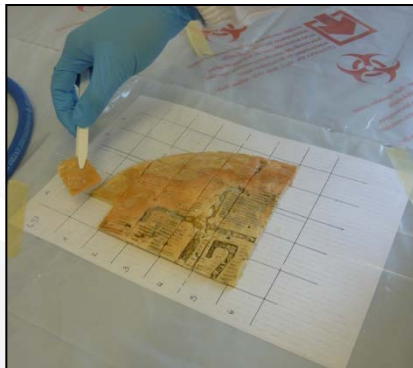
Risultati della analisi quantitative sui 37 quarti di crosta risultati positivi

| Lotti di produzione | Range di contaminazione da <i>L. monocytogenes</i> (UFC/g) | | | |
|------------------------|--|-------------------------|---------------------------|--------------|
| | $0.04 \leq Lm \leq 100$ | $101 \leq Lm \leq 1000$ | $1001 \leq Lm \leq 10000$ | ≥ 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 |



Valutazione della contaminazione del prodotto

- Delle 16 forme positive sono stati esaminati l'ultimo quarto di crosta disponibile suddivisi in quadratini di circa 9 cm² (704 determinazioni)
- Sono stati esaminati complessivamente 352 quadratini (per ricerca e numerazione) per determinare la distribuzione di *L. monocytogenes* sulla crosta



Valutazione della contaminazione del prodotto

L. monocytogenes è stata rilevata in:

- ✓ 9 quarti su 16 esaminati (56,2 %)
- ✓ 38 quadratini su 352 esaminati (10,8 %) con una carica compresa tra 0,04-0,3 MPN/g e >110 MPN/g





Risultati della analisi quantitative delle 352 porzioni dei quarti di crosta

| Lotti di produzione | N. porzioni quadrate | N. porzioni quadrate positive a L.m | Range di contaminazione da L. monocytogenes MPN/g | | |
|---------------------|----------------------|-------------------------------------|---|-------------|----------|
| | | | 0.3≤L.m | 0.4≤L.m≤110 | L.m≥110 |
| 1 | 24 | | | | |
| 1 | 21 | | | | |
| 1 | 22 | | | | |
| 1 | 22 | | | | |
| 1 | 22 | 2 | | 2 | |
| 2 | 20 | 1 | | 1 | |
| 2 | 22 | 2 | | 2 | |
| 2 | 22 | 2 | | 2 | |
| 2 | 22 | 2 | | 2 | |
| 4 | 22 | 2 | | 2 | |
| 4 | 21 | | | | |
| 4 | 22 | 4 | | 3 | 1 |
| 4 | 24 | 17 | 4 | 11 | 2 |
| 4 | 22 | 6 | | 5 | 1 |
| 5 | 22 | | | | |
| 5 | 22 | | | | |
| Totale | 352 | 38 | 4 | 30 | 4 |





RISULTATI

Azienda 2



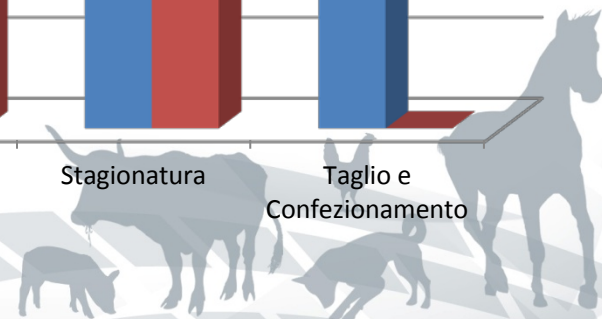
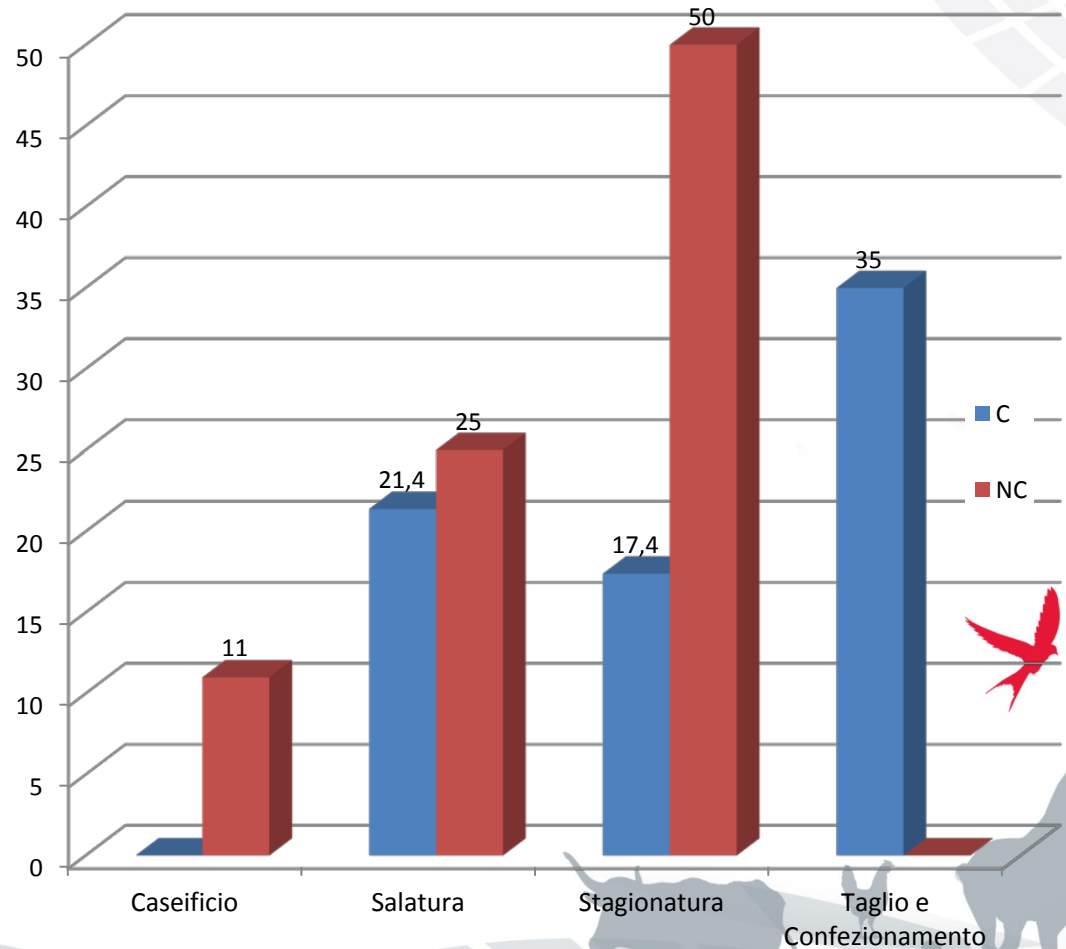


ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

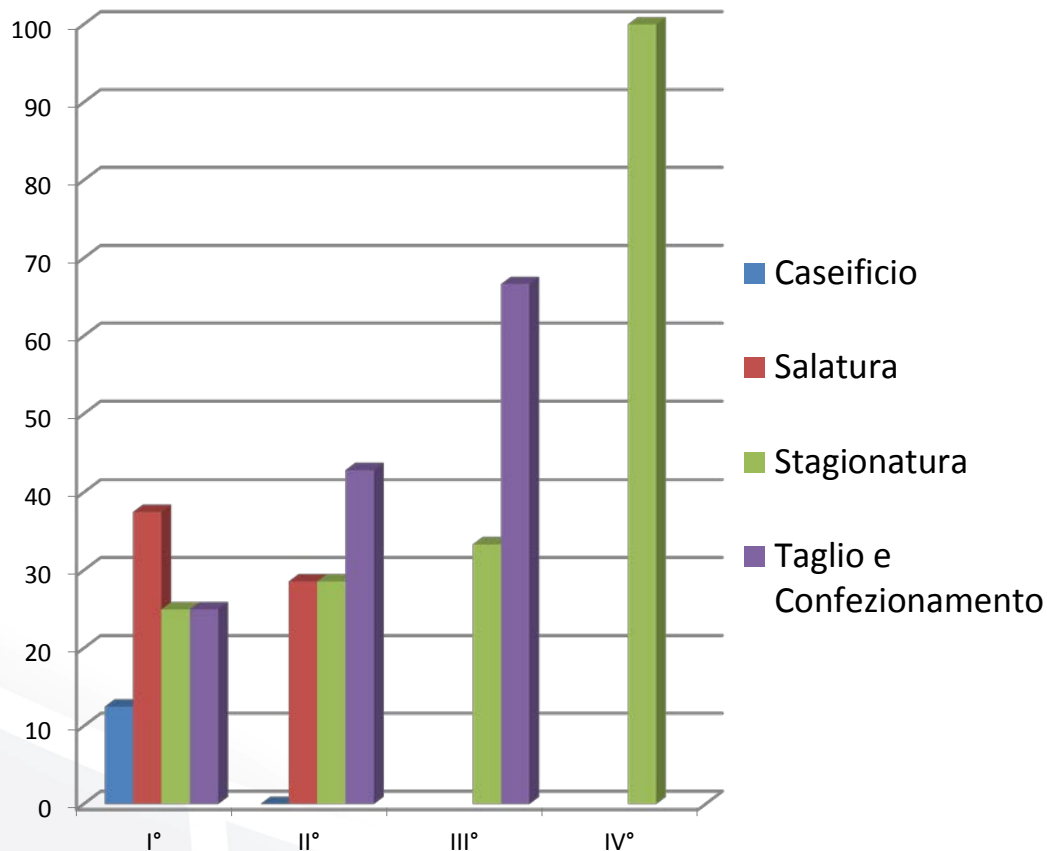
Valutazione della contaminazione ambientale

Azienda 2 RISULTATI

- Sono stati analizzati 89 campioni ambientali di cui 68 superfici a contatto e 21 non a contatto.
- Il 20,6% delle superficie a contatto e il 23,8% delle non a contatto sono risultate contaminate da *L. monocytogenes*
- **Listeria spp.** è stata rilevata in 2 campioni ambientali (2,2 %).



Valutazione della contaminazione ambientale



- **I° prelievo:** 8 campioni positivi (9%)
- **II° prelievo** 7 campioni positivi (7,9%)
- **III° prelievo** 3 campioni positivi (3,3%)
- **IV° prelievo** 1 campione positivo (1,1%)



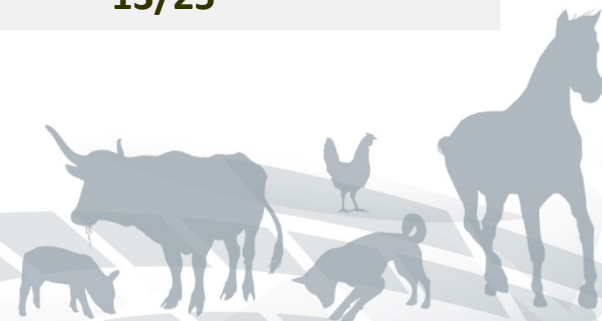
Valutazione della contaminazione del prodotto

- ✓ Sono state analizzate 25 mezza 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 mezza forme (48%) erano positive



Risultati della analisi qualitative su crosta e pasta

| Lotti di produzione | Numero di campioni positivi alla ricerca di <i>L. monocytogenes</i> /numero di campioni esaminati | | Numero di mezze forme positive alla ricerca di <i>L. monocytogenes</i> /numero mezze esaminati |
|---------------------|---|--------------|--|
| | <i>Crosta</i> | <i>pasta</i> | <i>Mezze forme</i> |
| 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 |



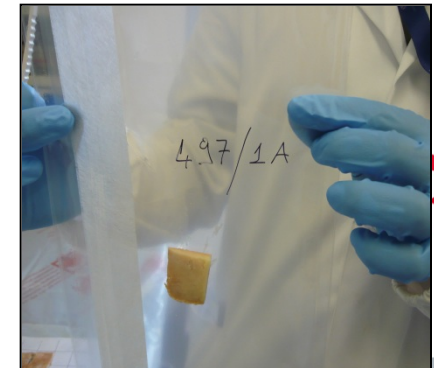
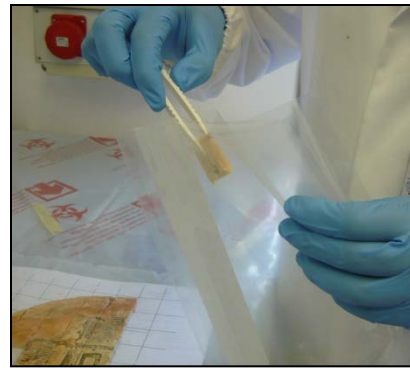
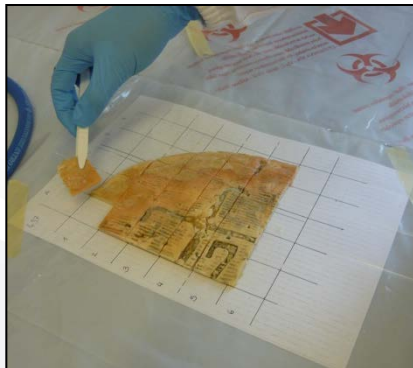
Risultati della analisi quantitative dei 24 quarti di crosta risultati positivi

| Lotti di produzione | Range di contaminazione da <i>L. monocytogenes</i> (UFC/g) | | | |
|---------------------|--|-------------------------|---------------------------|--------------|
| | $0.04 \leq Lm \leq 100$ | $101 \leq Lm \leq 1000$ | $1001 \leq Lm \leq 10000$ | ≥ 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 |



Valutazione della contaminazione del prodotto

- Delle 13 forme positive sono stati esaminati l'ultimo quarto di crosta disponibile suddivisi in quadratini di circa 9 cm²
- Sono stati esaminati complessivamente 285 quadratini (per ricerca e numerazione) per determinare la distribuzione di *L. monocytogenes* sulla crosta



Valutazione della contaminazione del prodotto

L. monocytogenes è stata rilevata in:

- ✓ 8 quarti su 13 esaminati (61,6 %)
- ✓ 18 quadratini su 285 esaminati (6,3 %) con una carica compresa tra 0,04-0,3 MPN/g e >110 MPN/g





Risultati della analisi quantitative delle 285 porzioni dei quarti di crosta

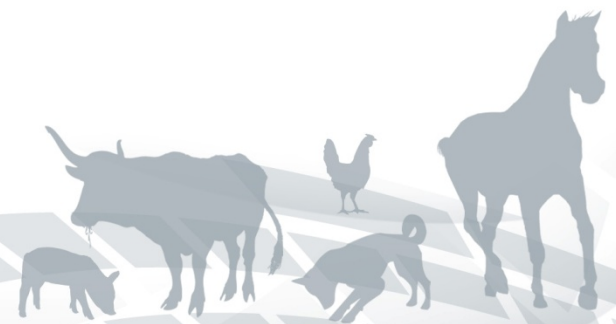
| Lotti di produzione | N. porzioni quadrate | N. porzioni quadrate positive a <i>L.m</i> | Range di contaminazione da <i>L. monocytogenes</i> MPN/g | | |
|---------------------|----------------------|--|--|-------------------------|----------------|
| | | | $0.3 \leq L.m$ | $0.4 \leq L.m \leq 110$ | $L.m \geq 110$ |
| 1 | 22 | 4 | | 3 | 1 |
| 1 | 22 | 2 | | 2 | |
| 1 | 22 | 3 | | | 3 |
| 1 | 22 | | | | |
| 1 | 22 | 1 | 1 | | |
| 2 | 23 | | | | |
| 2 | 22 | | | | |
| 2 | 22 | 3 | | 2 | 1 |
| 2 | 22 | 2 | | 1 | 1 |
| 2 | 22 | 1 | | | 1 |
| 3 | 22 | | | | |
| 3 | 20 | 2 | | 1 | 1 |
| 3 | 22 | | | | |
| Totale | 285 | 18 | 1 | 9 | 8 |





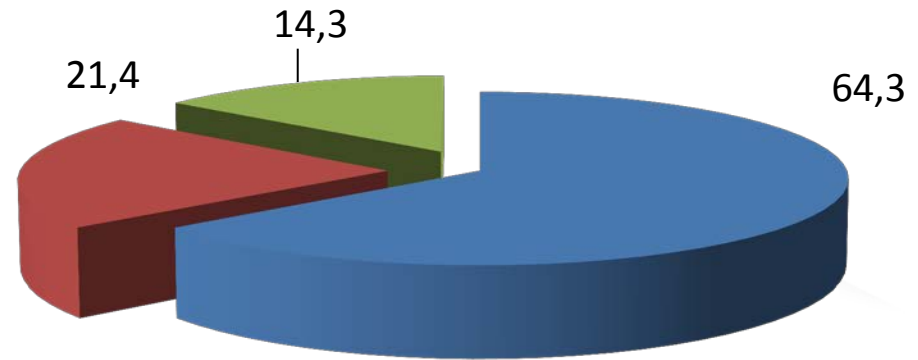
Risultati

Caratterizzazione fenotipica e genotipica dei ceppi di *L. monocytogenes* isolati



Caratterizzazione dei ceppi isolati nella *azienda 1*

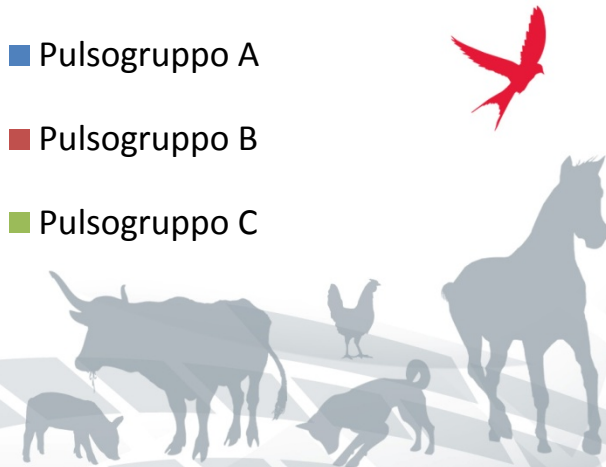
- Sono stati analizzati 14 ceppi
- 64,3% sierotipo 1/2a e 35,7% sierotipo 1/2b
- Sono stati riscontrati 3 pulsogruppi



■ Pulsogruppo A

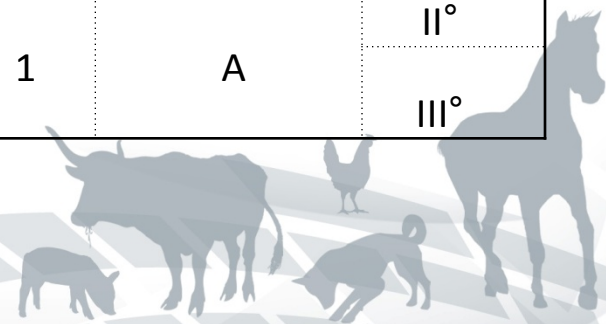
■ Pulsogruppo B

■ Pulsogruppo C



Caratterizzazione dei ceppi isolati *per area di lavorazione*

| Area di lavorazione | | Sierotipo | | Pulsotipo | | Pulsogruppo Prelievo | |
|--------------------------|-------|-----------|-------|-----------|-------|----------------------|-------------|
| | | 1/2 a | 1/2 b | Asc I | Apa I | | |
| 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° |
| | | 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° |



Dendrogramma ceppi azienda 1

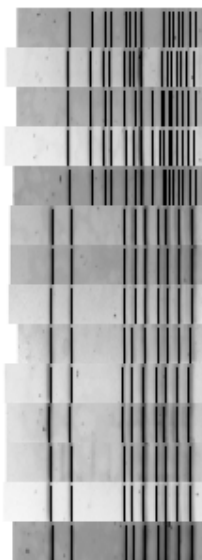
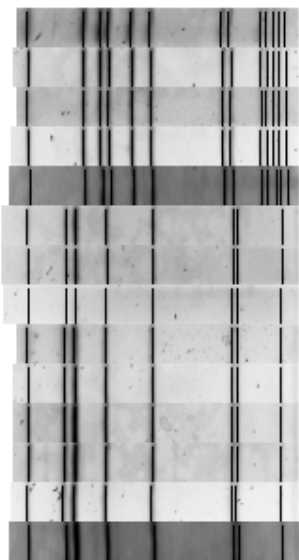
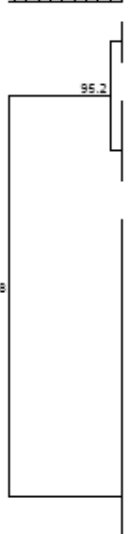


Ascl +Apal

PFGE-Ascl

PFGE-Apal

80 80 100

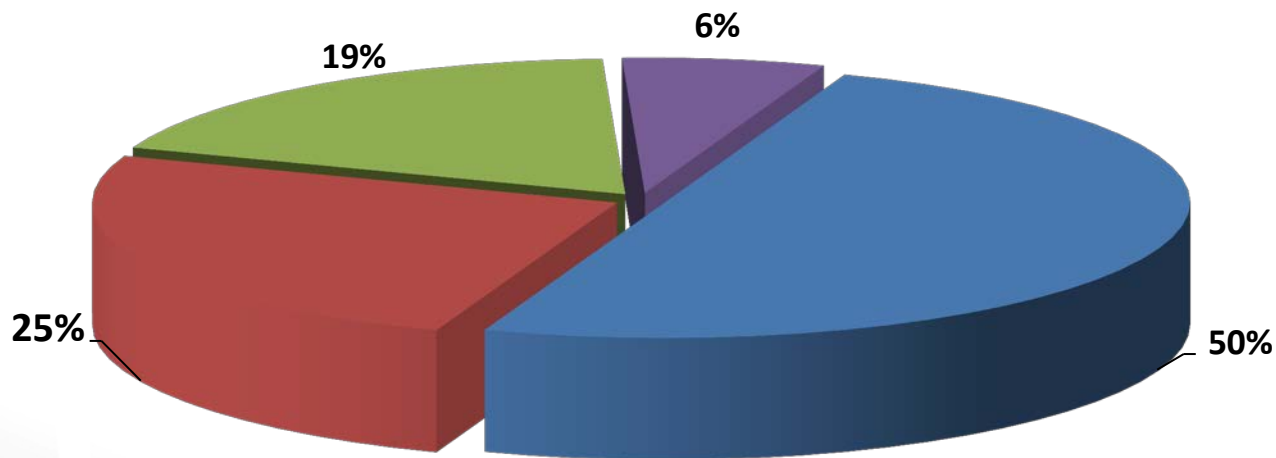


| Area di lavorazione | Tipo di superficie | Sierotipo | Pulsotipo Ascl | Pulsotipo Apal | Campionamento |
|--------------------------|--------------------|-----------|----------------|----------------|---------------|
| Stagionatura | C | 1/2 b | Pulsotipo 2 | Pulsotipo 3 | C IV° |
| Stagionatura | C | 1/2 b | Pulsotipo 2 | Pulsotipo 3 | C I° |
| Stagionatura | C | 1/2 b | Pulsotipo 2 | Pulsotipo 2 | B IV° |
| Salatura | NC | 1/2 b | Pulsotipo 2 | Pulsotipo 2 | B I° |
| Salatura | NC | 1/2 b | Pulsotipo 2 | Pulsotipo 2 | B III° |
| Taglio e confezionamento | C | 1/2 a | Pulsotipo 1 | Pulsotipo 1 | A II° |
| Taglio e confezionamento | C | 1/2 a | Pulsotipo 1 | Pulsotipo 1 | A II° |
| Salatura | NC | 1/2 a | Pulsotipo 1 | Pulsotipo 1 | A II° |
| Stagionatura | C | 1/2 a | Pulsotipo 1 | Pulsotipo 1 | A IV° |
| Stagionatura | C | 1/2 a | Pulsotipo 1 | Pulsotipo 1 | A I° |
| Stagionatura | C | 1/2 a | Pulsotipo 1 | Pulsotipo 1 | A I° |
| Confezionamento | C | 1/2 a | Pulsotipo 1 | Pulsotipo 1 | A I° |
| Caseificio | C | 1/2 a | Pulsotipo 1 | Pulsotipo 1 | A I° |
| Stagionatura | C | 1/2 a | Pulsotipo 1 | Pulsotipo 1 | A III° |

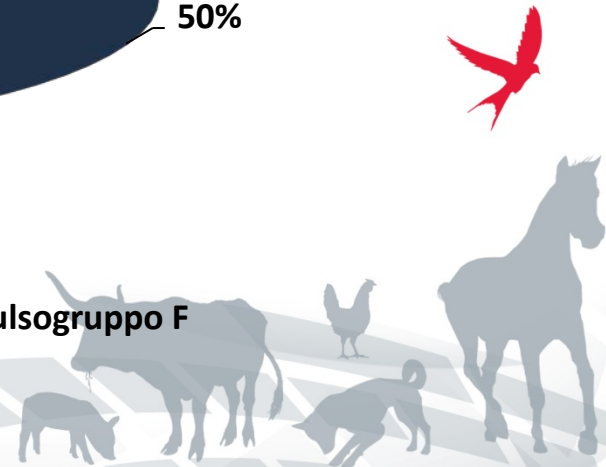


Caratterizzazione dei ceppi isolati nella *azienda 2*

- Tutti i ceppi appartenevano al sierotipo 1/2a
- Sono stati riscontrati 4 pulsogruppi:

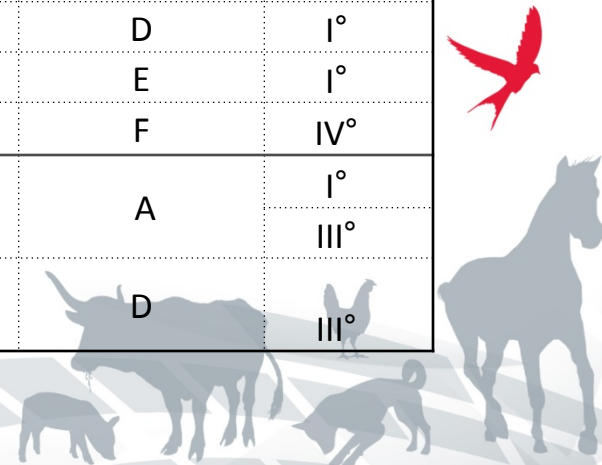


■ Pulsogruppo A ■ Pulsogruppo D ■ Pulsogruppo E ■ Pulsogruppo F



Caratterizzazione dei ceppi isolati *per area di lavorazione*

| Area di lavorazione | Ceppi | Sierotipo | Pulsotipo | | Pulsogruppo | Prelievo |
|--------------------------|-------|-----------|-----------|------|-------------|----------|
| | | 1/2 a | Ascl | Apal | | |
| 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° |
| | | 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° |
| | | 28,6% | 3 | 6 | D | III° |



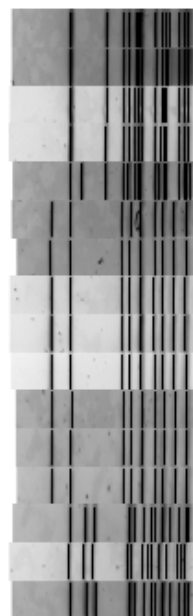
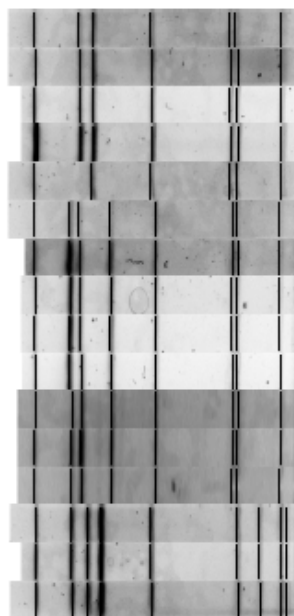
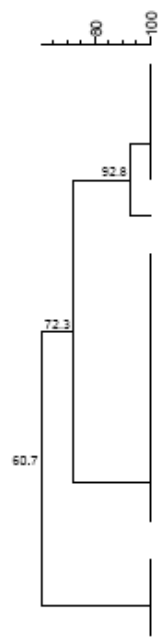
Dendrogramma ceppi azienda 2



Ascl +Apal

PFGE-Ascl

PFGE-Apal

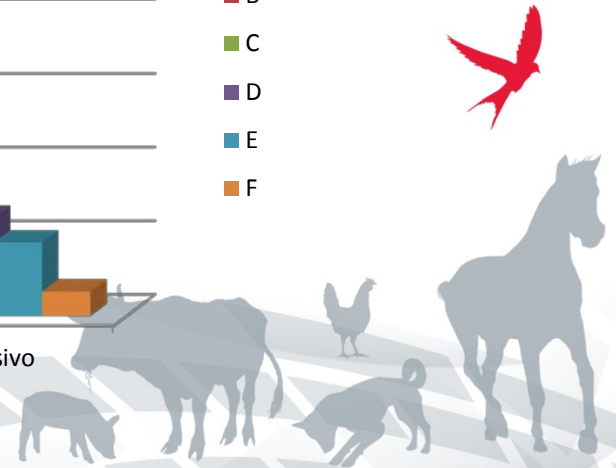
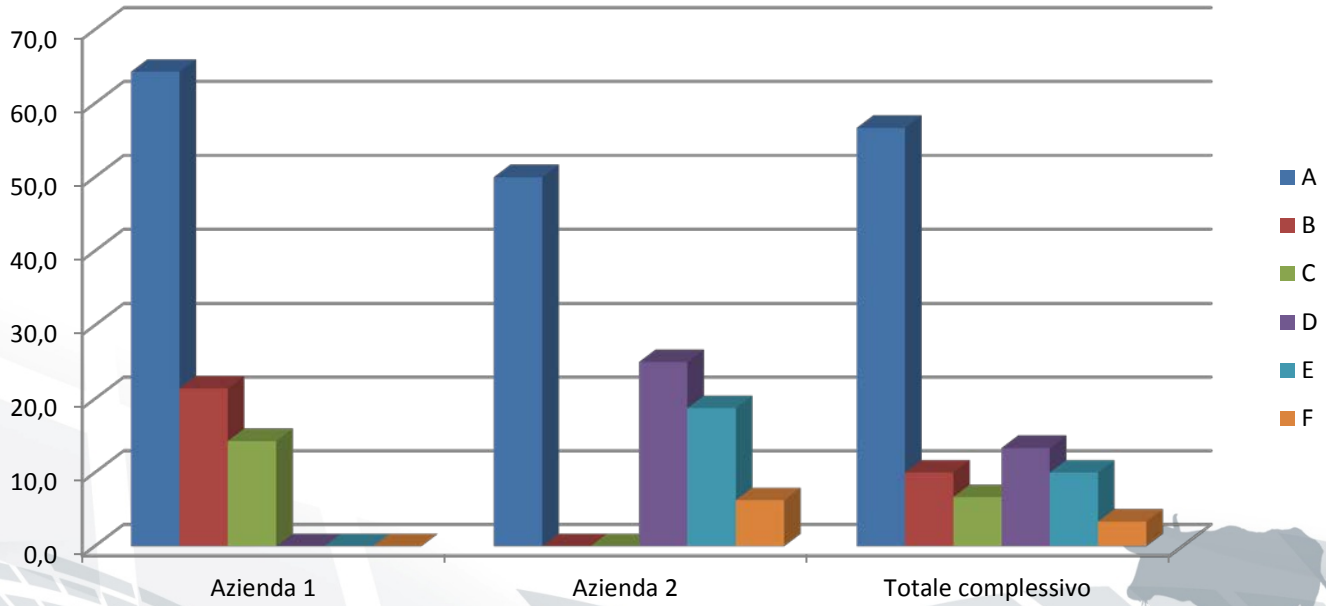


| Area di lavorazione | Tipo di superficie | Sierotipo | Pulsotipo Ascl | Pulsotipo Apal | Campionamento |
|--------------------------|--------------------|-----------|----------------|----------------|---------------|
| Taglio e confezionamento | C | 1/2 a | Pulsotipo 3 | Pulsotipo 6 | D II° |
| Taglio e confezionamento | C | 1/2 a | Pulsotipo 3 | Pulsotipo 6 | D II° |
| Stagionatura | C | 1/2 a | Pulsotipo 3 | Pulsotipo 6 | D I° |
| Salatura | C | 1/2 a | Pulsotipo 3 | Pulsotipo 6 | D I° |
| Stagionatura | NC | 1/2 a | Pulsotipo 5 | pulsotipo 5 | F II° |
| Taglio e confezionamento | C | 1/2 a | Pulsotipo 1 | Pulsotipo 1 | A II° |
| Stagionatura | C | 1/2 a | Pulsotipo 1 | Pulsotipo 1 | A IV° |
| Salatura | NC | 1/2 a | Pulsotipo 1 | Pulsotipo 1 | A I° |
| Confezionamento | C | 1/2 a | Pulsotipo 1 | Pulsotipo 1 | A I° |
| Confezionamento | C | 1/2 a | Pulsotipo 1 | Pulsotipo 1 | A I° |
| Stagionatura | C | 1/2 a | Pulsotipo 1 | Pulsotipo 1 | A III° |
| Taglio e confezionamento | C | 1/2 a | Pulsotipo 1 | Pulsotipo 1 | A III° |
| Taglio e confezionamento | C | 1/2 a | Pulsotipo 1 | Pulsotipo 1 | A III° |
| Stagionatura | C | 1/2 a | Pulsotipo 4 | Pulsotipo 4 | E I° |
| Caseificio | NC | 1/2 a | Pulsotipo 4 | Pulsotipo 4 | E I° |
| Salatura | NC | 1/2 a | Pulsotipo 4 | Pulsotipo 4 | E I° |

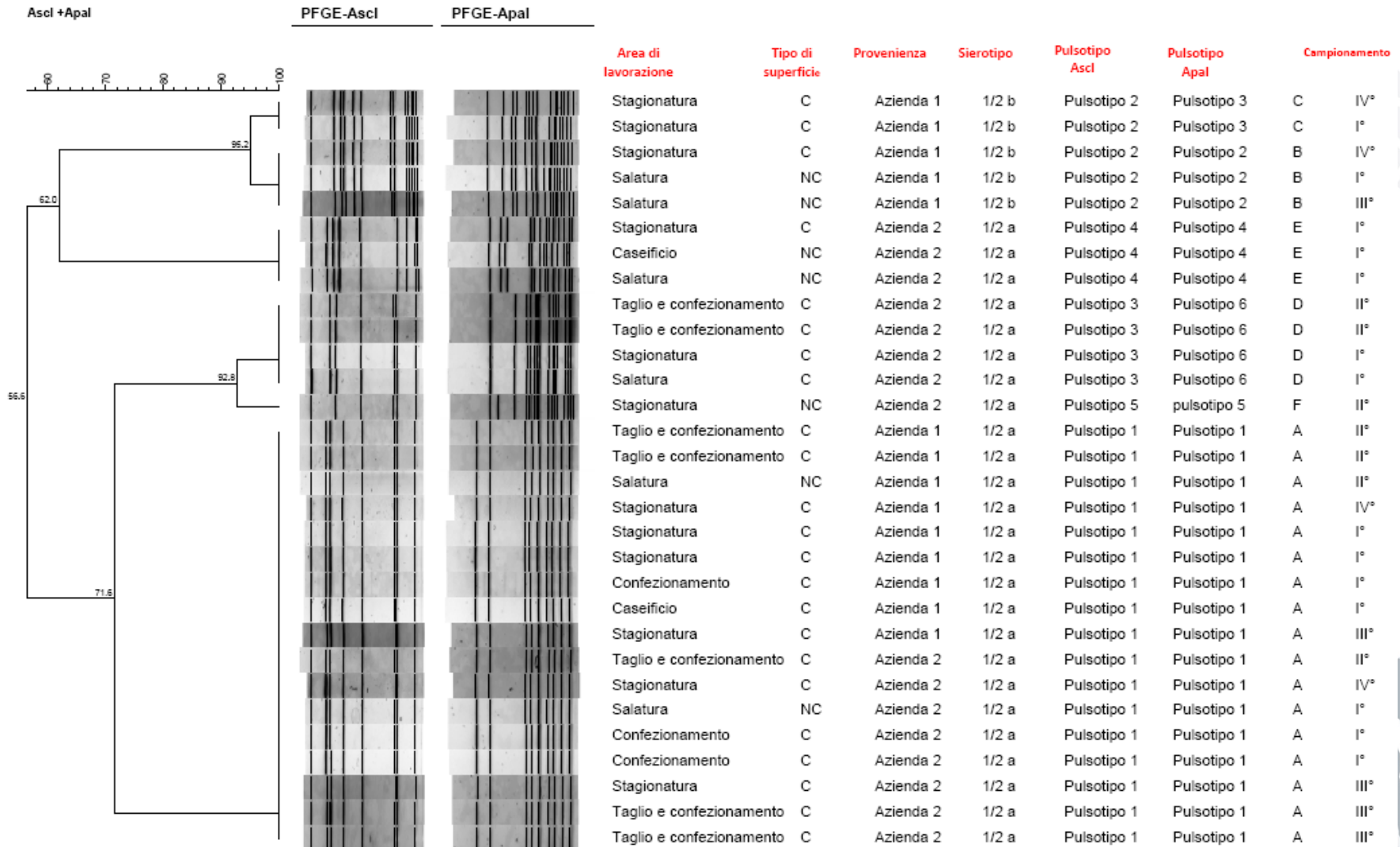


Complessivamente

- Il 83,6% dei ceppi apparteneva al sierotipo 1/2a e il 16,4% al sierotipo 1/2b
- Sono stati individuati 6 pulsogruppi



Dendrogramma di tutti i ceppi ambientali isolati in entrambi gli stabilimenti



Valutazione dei risultati

- ✓ 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*



Valutazione dei risultati

- ✓ Dalla analisi dei profili genetici dei ceppi isolati nelle due aziende si è individuato un pulsogruppo predominante (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.



Valutazione dei risultati

- ✓ 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 è risultata sempre non contaminata.
- ✓ La crosta si conferma un'importante fonte di contaminazione





GRAZIE

Istituto G. Caporale - Teramo