

RICERCA E TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI LISTERIA NELLA FILIERA DI PRODUZIONE DI GORGONZOLA DOP

DETECTION AND CHARACTERISATION OF LISTERIA ISOLATES COLLECTED ALONG THE GORGONZOLA PDO PRODUCTION CHAIN

Nucera D., Morra P., Grassi M.A.

Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino

SUMMARY

Considering that *Listeria monocytogenes* represents a concern in the production of Gorgonzola PDO cheese, this study was aimed to investigate the presence of *Listeria* along one Gorgonzola PDO production chain. *L. monocytogenes* subtype diversity was also investigated in order to identify possible reservoirs and dissemination routes. One dairy plant and its conferring farms (N=20) were selected and samples were collected in 4 visits in order to investigate seasonal variability. In each of them, producer tank milk (N=80), Gorgonzola producer tanks (N=12), Gorgonzola producer environmental samples (N=108) were collected, for a total of 200 samples. *L. innocua* was isolated from 3 milk samples (4%); *L. monocytogenes* alone was detected in 3 environmental samples (16%) and *L. innocua* in 11 (58%). Both species were present in 5 samples. All *Listeria* strains isolated were typed through ERIC and REP PCRs. For each sample, if possible 5 colonies were selected for typing, for a total of 76 isolates. The analyses allowed the differentiation of *L. monocytogenes* and *L. innocua* in 9 and 7 PCR profiles (P), respectively. The former showed an overall similarity value of 75% and the latter of 81%. P1 (N=3) of *L. monocytogenes* was present in multiple sources (ripening surfaces and salting equipment) and P5 (N=6) in different sampling rounds (January and June 2009). P1 (N=25) and P2 (N=15) of *L. innocua* were found in multiple sources (performing equipment, ripening surfaces, salting equipment, moving carts) and in multiple sample rounds (P1: May 2008, January and June 2009; P2: June and October 2009). The presence of a few highly similar strains of *L. monocytogenes* in the production chain, as suggested by the profiles retrieved from different sources/sampling rounds, indicates the presence of persistent and niche-adapted strains. However, no profile was shared between raw milk and environmental samples, suggesting that the plant environment, not the incoming raw milk, is the source of strains contaminating Gorgonzola cheese.

KEYWORDS

Listeria monocytogenes, Gorgonzola, Genotyping, Reservoirs, Production chain

INTRODUZIONE

Il Gorgonzola è un formaggio erborinato a pasta molle ottenuto da latte di vacca intero pastorizzato, aggiunto di fermenti lattici e muffe selezionate. Il particolare tipo di processo ed i parametri intrinseci del formaggio durante la maturazione, lo rendono un substrato idoneo per la sopravvivenza e la moltiplicazione di *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*.

Al fine di ottenere informazioni dettagliate sulla presenza di *Listeria* lungo la filiera, a fianco

delle metodiche ISO per l'isolamento, si utilizzano tecniche di caratterizzazione biomolecolare che consentono di discriminare i microrganismi con una risoluzione maggiore rispetto alla sola identificazione di specie. L'applicazione dell'elettroforesi in campo pulsato (PFGE) o della Repetitive Element PCR (REP), si è dimostrata un ottimo ausilio sia per risalire alle possibili fonti di un outbreak, sia per poter maturare delle ipotesi sulle possibili vie di contaminazione lungo la filiera produttiva (1, 2).

Lo scopo di questa ricerca, svolta nell'ambito di

un progetto più ampio, finalizzato al monitoraggio della presenza di *Listeria* nella filiera produttiva del Gorgonzola DOP (*from stable to table*), è stato quello di valutare la presenza di tale microrganismo e la variabilità dei pattern genotipici degli isolati ottenuti da una filiera costituita da 20 produttori che conferiscono ad un unico caseificio produttore di Gorgonzola DOP.

MATERIALI E METODI

Campioni: il caseificio ed i relativi conferenti, sono stati campionati in 4 differenti momenti (Maggio 2008 - Ottobre 2009), per poter osservare un'eventuale variabilità stagionale nell'isolamento e nei pattern genotipici. Sono stati analizzati un totale di 200 campioni. In particolare, in ognuna delle 4 visite, per la ricerca di *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* sono stati eseguiti prelievi da:

1. latte raccolto presso le aziende zootecniche: dal tank refrigerato per lo stoccaggio, per ogni singolo produttore, si è provveduto alla raccolta di 50 ml di latte, per un totale di 20 campioni/visita;
2. latte di massa all'arrivo al caseificio: dalla cisterna di raccolta latte all'ingresso sono state raccolte 3 aliquote da 50 ml ciascuna, per ognuna delle 4 visite;
3. caseificio: per l'identificazione dei punti in cui effettuare i prelievi ambientali, ci si è basati sia sul flusso e processo produttivo, sia sui risultati riportati dal progetto Golis (3). I prelievi sono stati eseguiti, al termine delle operazioni di sanificazione, su diverse superfici ed attrezzature, per un totale di 27 spongature/visita (Tabella1). Tutti i prelievi sono stati eseguiti con la metodica "sponge bag" (Solar - Cult Cellulose Sponge, BIOGENETICS), delimitando sterilmente:

un'area pari a 100 cm² relativamente ai seguenti punti di campionamento: ripiani legno cella riposo, ripiano camerino salatura, ripiani celle di stagionatura, parete zona lavaggio fascere, superficie carrellino salatore;

un'area di 500 cm², ottenuta realizzando prelievi da 100 cm² in 5 differenti punti dalle seguenti superfici: spersori locale caseificazione, caldaie locale caseificazione, "padellino" di raccolta (locale caseificazione), ripiano cella di stoccaggio forme (per altri produttori).

Ricerca ed identificazione di Listeria spp. e *L. monocytogenes*: la ricerca di *Listeria* è stata eseguita con metodica ISO 11290-1 (4), utilizzando come terreni agarizzati di crescita il Palcam Agar e l'Oxoid Chromogenic *Listeria* Agar (OCLA) - OXOID al fine di poter evidenziare la

presenza di colonie riconducibili a *Listeria* spp o *L. monocytogenes*, rispettivamente. In particolare, dove possibile, si è provveduto ad isolare fino a 5 colonie, per poter poi procedere con le analisi di identificazione e caratterizzazione. Le colonie riconducibili a *L. monocytogenes* sono state sottoposte ad identificazione tramite *prfA*-PCR (5). Le colonie sospette *Listeria* spp. sono state sottoposte a PCR per l'amplificazione di un frammento del gene 16S rDNA (600bp), utilizzando il protocollo come da indicazioni (Micro seq 500 16S rDNA Bacterial Sequencing Kit). Il frammento è stato sequenziato e le sequenze sono state confrontate con quelle presenti nel database di GeneBank attraverso il programma BLASTn, identificando così la specie di appartenenza.

Caratterizzazione di Listeria spp. e *L. monocytogenes*: un totale di 76 isolati, identificati come descritto in precedenza, sono stati sottoposti alle analisi di caratterizzazione, utilizzando la metodica REP-PCR. In particolare si sono usati sia i primers ERIC che i primers REP, seguendo i protocolli riportati in letteratura (6), ed apportando alcune modifiche: aumento temperatura di annealing e della percentuale di agarosio del gel di corsa elettroforetica. Dopo amplificazione, i prodotti di PCR sono stati sottoposti ad una migrazione elettroforetica in campo lineare e, dopo la corsa e la successiva colorazione in bromuro di etidio, sono stati visualizzati mediante GelDoc (Applied Biosystems). I pattern generati sono stati analizzati utilizzando il software BioNumerics (Applied Maths). Per l'analisi sono stati impostati i parametri di tolleranza di posizione e di ottimizzazione a 2,5%. I confronti tra ogni coppia di pattern sono stati eseguiti utilizzando il coefficiente Dice, con produzione di una matrice di distanze. Le analisi sono state condotte separatamente per i primers REP e per gli ERIC. Le matrici ottenute dai singoli primers sono state combinate in una unica, per poter produrre un dendrogramma utilizzando l'algoritmo UPGMA. Si è proceduto a creare un dendrogramma per gli isolati di *L. monocytogenes* ed uno per quelli di *Listeria* spp. Sono stati considerati indistinguibili isolati che superavano il 95% di similitudine. Tale cut-off è stato stabilito a seguito di prove di ripetibilità effettuate su un set di 5 isolati testati in triplicato.

RISULTATI

Ricerca ed identificazione di Listeria spp. e *L. monocytogenes*: sulla totalità dei campioni analizzati (latte ed ambientali) sono risultate presenti due sole specie: *L. monocytogenes* ed *L. innocua*. In particolare, dai campioni di latte raccolti presso i conferenti è stato possibile isolare *L. innocua* solo da 3 aziende (4%), mentre

la ricerca di *L. monocytogenes* ha dato esito costantemente negativo. Nessun conferente è risultato positivo a più di una visita. Per quanto riguarda le *sponges* prelevate in caseificio, è stato possibile isolare microrganismi appartenenti al genere *Listeria* in 19 *sponges* delle 108 analizzate (18%). In particolare *L. monocytogenes* come unica specie è stata identificata in 3 campioni (16%) e *L. innocua* in 11 (58%). In 5 campioni è invece stato possibile isolare entrambe le specie (Tab1). I risultati positivi si sono ottenuti da 12 dei 27 punti di prelievo selezionati: in 4 superfici/macchinari la contaminazione è stata rilevata in più sopralluoghi (Tab1): il carrello per la movimentazione delle forme e la salatrice hanno permesso, infatti, l'isolamento di *L. monocytogenes* in 3 visite. Particolare importanza assume l'isolamento, nella spazzola della salatrice, di *L. monocytogenes* sia nella prima, che nell'ultima visita, effettuate a distanza di 17 mesi.

Caratterizzazione di *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*: un totale di 76 colonie isolate da 22 campioni (di latte ed ambientali) sono state analizzate con la REP-PCR. Le analisi ottenute dalla combinazione dei risultati della ERIC e della REP-PCR hanno permesso di evidenziare, in entrambe le specie, un alto livello di similitudine tra gli isolati testati: 81% (*L. innocua*) e 75% (*L. monocytogenes*). Per quanto riguarda *L. innocua* gli isolati sono stati raggruppati in 7 profili, di cui 2 (P1 e P2) comprendenti la maggior parte degli isolati (N=35). Gli isolati di *L. monocytogenes* sono invece stati raggruppati in 9 profili con una media di 3 isolati ciascuno (Fig1 e Fig2). Considerando la differenza genotipica all'interno dello stesso campione, per quanto riguarda *L. innocua* sono stati recuperati due differenti profili solo dal ripiano della cella di stagionatura, mentre per i rimanenti campioni, le colonie testate sono risultate indistinguibili. Analogamente, anche per *L. monocytogenes* si sono riscontrati due profili differenti in 3 degli 8 campioni analizzati: ripiano della cella di stagionatura e ruote del carrello di movimentazione delle forme (sia nel sopralluogo di gennaio che di giugno).

I risultati hanno permesso di evidenziare, in entrambe le specie, la presenza di profili genetici comuni ad isolati provenienti da superfici e/o visite differenti (Fig1 e Fig2). In particolare P1 di *L. innocua* era condiviso tra isolati provenienti dai sopralluoghi di maggio 2008 e giugno 2009, così come da differenti superfici, sia del locale di caseificazione, che di stagionatura, ma anche dalla parete della zona lavaggio fascere e dalla macchina salatrice e foratrice (Fig1). Anche il profilo P2 è stato rilevato in 2 momenti temporali (giugno-ottobre 2009), su superfici

differenti, quali la parete vicino alla zona di lavaggio delle fascette, la spazzola della salatrice e gli aghi della foratrice. Tuttavia lo stesso profilo è stato rilevato anche nella zona di confezionamento, sulla taglierina.

Considerando invece *L. monocytogenes*, è stato possibile osservare due profili condivisi da isolati provenienti da sopralluoghi/superfici diversi: P1 e P5 (Fig2). P1 è risultato presente sulla stessa superficie a distanza di 6 mesi, mentre P5 è stato rilevato solo in un sopralluogo, ma da due superfici differenti: assi di stagionatura e spazzola della salatrice.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

L'analisi di campioni prelevati lungo la filiera produttiva del Gorgonzola DOP prodotto nel caseificio monitorato nella presente ricerca, ha permesso di evidenziare come la presenza di *Listeria* sia un problema sempre attuale e ricorrente. Il latte, in base ai risultati ottenuti, non è risultato essere frequentemente contaminato. Infatti, solo 3 positività, peraltro di *L. innocua*, indicano come le probabilità che il microrganismo riesca ad essere isolato dal tank di raccolta siano molto basse, probabilmente a fronte delle limitate cariche contaminanti. Tuttavia, l'analisi genotipica degli isolati di *L. innocua* provenienti dal latte e dal caseificio ha permesso di riscontrare come siano geneticamente omogenei, confermando la possibilità per il latte, qualora non siano rigorosamente applicate GMP e GHP, di essere una possibile fonte d'ingresso di questa specie nel caseificio. L'analisi del dendrogramma mostra inoltre che, seppur geneticamente molto simili, i ceppi isolati dai campioni di latte tendono ad essere distinti da quelli isolati nel caseificio, consentendo non solo di confermare l'ipotesi di una possibile contaminazione dell'ambiente da parte di ceppi provenienti dal latte, ma di evidenziare la capacità di tali ceppi di adattarsi, una volta entrati in caseificio, al nuovo ambiente, differenziandosi dai "progenitori". Purtroppo, tale ipotesi non può essere estesa anche a *L. monocytogenes*, dato che il patogeno non è stato riscontrato in nessuno dei campioni di latte analizzati.

L'analisi dei risultati dei prelievi ambientali in caseificio ha permesso di riscontrare che le frequenze di isolamento sono basse nei locali e nelle attrezzature destinate alla caseificazione, spurgo e salatura (9% sul totale dei prelievi). Al contrario, sono molto più elevate le frequenze in fase di stagionatura, sia negli ambienti che nelle attrezzature utilizzate per la salatura e per la foratura (30%).

La frequenza di isolamento di *L. innocua* è risultata superiore a quella di *L. monocytogenes*,

evidenziando una diversa frequenza delle due specie nell'ambiente. Tuttavia, l'analisi genotipica ha evidenziato una notevole omogeneità dei ceppi sia di *L. innocua*, che di *L. monocytogenes*, suggerendo la possibile presenza di ceppi adattati alla particolare nicchia di produzione considerata, come confermano la sovrapposibilità delle frequenze degli isolamenti nelle diverse visite ed il riscontro di ceppi presenti su più superfici e/o in diversi momenti di prelievo. Considerando le informazioni ricavate dall'analisi dei profili genetici degli isolati, è possibile osservare come il comportamento delle due specie sia sovrapposibile, suggerendo *L. innocua* come un possibile indicatore del potenziale di contaminazione da parte di *L. monocytogenes*. Tuttavia, recentemente in letteratura (7) si fa riferimento ad un fenomeno di antagonismo tra le specie, per cui la presenza di *Listeria* spp. riduce le probabilità di contaminazione da parte di *L. monocytogenes*. I risultati della nostra indagine sembrerebbero avvalorare questa ipotesi in quanto, solo su 3 campioni, è stato possibile isolare unicamente *L. monocytogenes*.

Di particolare interesse la sovrapposibilità delle frequenze d'isolamento nelle diverse visite, a dimostrazione del fatto che la contaminazione di *Listeria* in caseificio non presenta un andamento stagionale, ma è legato alla presenza di ceppi verosimilmente adattati agli ambienti di lavorazione, come evidenziato dall'elevata similitudine dei profili genetici. Non è stato infatti infrequente notare come alcune superfici siano risultate positive in più visite successive; particolare importanza assume tale risultato relativamente ai ripiani della cella stagionatura, alla spazzola della salinatrice ed alle ruote del carrello, in cui *L. monocytogenes* è stata isolata ben due volte. Le cause sono verosimilmente da ricercare in una scarsa efficacia del piano di sanificazione, oppure nella capacità del microrganismo di formare biofilm e dunque resistere ai trattamenti sanificanti. Tali osservazioni sono supportate anche dal riscontro di identici profili genotipici in momenti temporali differenti, indice di una persistenza della contaminazione, sia da parte di specie patogene che non.

Infine, di particolare rilievo critico è la presenza del microrganismo in attrezzature quali la foratrice, la salatrice, le ruote dei carrelli e la taglierina: tale riscontro suggerisce la potenziale diffusione del patogeno all'interno dello stabilimento e tra le diverse forme in stagionatura, come evidenziano i profili identici rilevati in superfici differenti, campionate nello stesso sopralluogo.

I risultati della presente ricerca evidenziano come l'analisi condotta lungo la filiera di produzione da noi considerata, abbia permesso di ipo-

tizzare che la contaminazione di *Listeria* sia attribuibile più che a ceppi presenti in produzione primaria, a quelli residenti in stabilimento ed adattati alla specifica nicchia di produzione (8); tale dato conferma indirettamente l'efficacia del trattamento termico del latte in ingresso che ne interrompe il flusso e la diffusione mediante la materia prima. La presente ricerca si colloca infatti in un progetto più ampio che persegue l'obiettivo di comprendere i legami tra ambiente "azienda zootecnica" e caseificio, al fine di mettere in atto soluzioni per il contenimento di *L. monocytogenes*. A tale fine sono stati analizzati sia campioni di differenti tipologie di "feed" prelevati presso le aziende conferenti, sia campioni di feci degli animali in lattazione. Contrariamente a quanto ci si aspettava, in nessun caso si sono rilevati genotipi condivisi tra i due ambienti considerati (azienda e caseificio), come ad indicare che in caseificio siano presenti e persistenti ceppi caratteristici ("house flora") adattati alle specifiche condizioni ambientali del caseificio esaminato. Tale ipotesi è ulteriormente confermata dalle frequenze delle contaminazioni nei diversi prelievi che dimostrano come le positività non abbiano un andamento stagionale, contrariamente invece a quanto avviene nell'ambiente "azienda zootecnica", dove il microrganismo viene costantemente reintrodotta, come dimostra la notevole variabilità genetica tra isolati delle aziende zootecniche (dati non presentati). La presenza di ceppi persistenti ed adattati alla nicchie di produzione specifiche sarà oggetto di ulteriori ricerche volte ad analizzare quali possano essere i fattori legati alla persistenza. Le possibili cause potrebbero essere riconducibili ad una non corretta esecuzione delle procedure di sanificazione (dosi del principio attivo e modalità/tempi di applicazione), oppure alla resistenza dei ceppi alle sostanze sanificanti comunemente utilizzate nell'impianto. Si valuterà inoltre la capacità di tali ceppi di produrre biofilm su superfici, in quanto *L. monocytogenes* in forma aggregata è in grado di resistere all'azione dei sanificanti, protetta dalla matrice extracellulare. Queste osservazioni potrebbero risultare nella definizione di un piano di sanificazione "ad hoc" sia per quanto riguarda il principio attivo impiegato, sia per le modalità di applicazione e le sedi da trattare, che potrebbe consentire una riduzione della frequenza delle contaminazioni in caseificio.

Progetto "Incidenza e livello di contaminazione da *Listeria monocytogenes* negli insilati aziendali e ripercussioni sulle produzioni lattierocasearie nella filiera del gorgonzola DOP" eseguito con fondo Regione Piemonte-Direzione Sviluppo Agricoltura, 2007.

BIBLIOGRAFIA

1. Chou, C.H., Wang, C. (2006). Genetic relatedness between *Listeria monocytogenes* isolates from seafood and humans using PFGE and REP-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 135-148.
2. Lomonaco, S., Decastelli, L., Nucera, D., Gallina, S., Bianchi, D.M., Civera, T. (2009). *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: subtypes, diversity and persistence over time. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 516-520.
3. Progetto GOLIS, 2004. Il formaggio Gorgonzola e il problema *Listeria monocytogenes* (GOLIS) Regione Lombardia, Consorzio per la tutela del Gorgonzola e Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia.
4. ISO 1190-1, 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method.
5. D'Agostino, M., Wagner, M., Vázquez-Boland, J.A., Kuchta, T., Kapriskova, R., Hoofar, J., Novella, S., Scortti, M., Ellison, J., Murray, A., Fernandez, I., Kuhn, M., Pazlarova, J.m, Heuvelink, A., Cook, N. (2004). A validated PCR method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model towards an international standard. *Journal of Food Protection*, 67, 1646-1655.
6. Jersek, B., Gilot, P., Gubina, M., Klun, N., Mehle, J., Tcherneva, E., Rijpens, N., Herman, L. (1999). Typing of *Listeria monocytogenes* Strains by Repetitive Element Sequence-Based PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 103-109.
7. Williams, S.K., Roof, S., Boyle, E.A., Burson, D., Thippareddi, H., Geornaras, I., Sofos, J.N., Wiedmann, M., Nightingale, K. (2011). Molecular ecology of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in small and very small Ready-to-Eat meat processing plants. *Journal of Food Protection*, 74, 63-77.
8. Latorre, A.A., Van Kessel, J.A.S., Karns, J.S., Zurakowski, M.J., Pradhan, A.K., Boor, K.J., Adolph, E., Sukhnanand, S., Schukken, Y.H. (2011). Molecular ecology of *Listeria monocytogenes*: predominant and persistent strains showed increased *in-vitro* adherence and on-farm persistence in the milking system. *Applied Environmental Microbiology*, doi:10.1128/AEM.02441-10.

Tabella 1. Elenco delle 12 sedi di prelievo da cui è stato possibile isolare *L. monocytogenes* (*L.m.*) e *L. innocua* (*L.i.*).

SEDE PRELIEVO	Momento prelievo							
	Maggio 08		Gennaio 09		Giugno 09		Ottobre 09	
	L. i.	L. m.	L. i.	L. m.	L. i.	L. m.	L. i.	L. m.
LOCALE CASEIFICAZIONE: RUOTE CARRELLO			+					
LOCALE CASEIFICAZIONE: MANIGLIA (DIREZ BAGNO)						+		
CAMERINO SALATURA: RIPIANO SALATORE		+						
STAGIONATURA NUOVA: RIPIANO (Gorgonzola)			+					
LAVAGGIO FASCERE: PARETE			+		+			
<u>STAGIONATURA VECCHIA: RIPIANO CARRELLO TRA CELLE</u>	+	+	+	+			+	
<u>FORATRICE</u>	+				+			
<u>SALATRICE</u>	+	+			+		+	+
PIANO SUP: CELLA RIPIANI			+					
CONFEZIONAMENTO: FILO TAGLIERINA							+	

Le sottolineature identificano le sedi risultate positive in più sopralluoghi, mentre in grigio sono evidenziate le sedi da cui sono state isolate entrambe le specie. Non si sono riscontrate positività in altre 15 sedi di prelievo: spersori (4), caldaia (2), stampigliatura del lotto, stampi, sovrastampi, padellino di raccolta e canalina di raccolta del siero (Locale Caseificazione), ripiano in legno (2) (Cella di Riposo), ripiano in legno (Cella di stagionatura nuova: ripiano taleggio).

Figura 1. Dendrogramma generato dalla combinazione dei pattern ERIC e REP dei 46 isolati di *L. innocua*. In riquadro i due profili più frequenti (P1 e P2).



Figura 2. Dendrogramma generato dalla combinazione dei pattern ERIC e REP dei 30 isolati di *L. monocytogenes*. In riquadro i due profili più frequenti (P1 e P5).

