

Prevalence of *L. monocytogenes* in environmental samples collected in dairy plants of Sassari Province, Italy

Giovanni Terrosu,¹ Antonio Fadda,²
Giorgio Frongia,² Antonietta Sanna,²
Rita Melillo,¹ Antonio Fadda¹

¹Food Hygiene Unit, Laboratory of Milk Microbiology, Institute for Experimental Veterinary Medicine of Sardinia, Sassari;
²Livestock and Animal Husbandry Hygiene Service, Local Health Unit n.1, Sassari, Italy

Abstract

Listeria (L.) monocytogenes is frequently isolated from food production environment and often persists in dairy plants despite vigorous sanitation regimes. In recent years several alert notifications were sent to *Rapid Alert System for Food Products* system as a consequence of *Listeria monocytogenes* contamination of ricotta cheese. After the alert of 2012, competent authority (Local Health Unit of Sassari Province) organised an environmental monitoring plan with the partnership of the Institute for Experimental Veterinary Medicine of Sardinia to verify analysis of dairy plants own-check according to Regulation (EC) N° 2073/05 and further modifications. In 2014 n. 665 processing areas samples of n. 50 dairy plants of Sassari Province were examined. UNI EN ISO 11290-1:2005 for detection of *L. monocytogenes* was used. Non-compliance in n. 5 dairy plants are observed (n. 8 positive samples). Post-non-compliance environmental sanitisation was efficient and own-check plans included appropriate corrective actions.

Introduzione

Listeria monocytogenes (L. monocytogenes) è un batterio Gram-positivo, psicrotrofo e anaerobio facoltativo che tende a persistere negli ambienti dei caseifici anche dopo ripetute sanificazioni. Può provocare meningite, aborto e si distingue per la sua elevata letalità. Le caratteristiche fisiologiche consentono al microorganismo di sopravvivere e, sia pure in misura ridotta, di moltiplicare anche in condizioni ambientali sfavorevoli per altri patogeni (pH fino a 5,0, concentrazioni di NaCl fino al 10%, temperature di +2/+4°C o anche inferiori) (Comitato Nazionale Per La Sicurezza Alimentare, 2009). Diversi studi hanno dimo-

strato la sua capacità di contaminare e svilupparsi in diversi prodotti lattiero-caseari come, per esempio, la ricotta salata. Considerato che il processo di produzione della ricotta salata prevede un trattamento termico del siero tra gli 80-90°C, si può dedurre che la contaminazione del prodotto da parte di *L. monocytogenes* avvenga nelle fasi successive, in particolare in quelle di salatura, stagionatura e pulitura/spazzolatura delle forme. Inoltre con l'utilizzo del confezionamento sottovuoto è stato modificato il processo di produzione tradizionale, il quale garantiva il risanamento del prodotto, anche se inizialmente contaminato, attraverso una lunga stagionatura e la conseguente diminuzione del valore di a_w . Attualmente il prodotto viene per lo più confezionato pochi giorni (7-10) dopo la salatura, consentendo il perdurare di condizioni favorevoli allo sviluppo di *L. monocytogenes*. Infine va sottolineato che prima di arrivare al consumatore finale le forme intere di ricotta sotto-vuoto possono essere sottoposte a ulteriori manipolazioni, come la porzionatura e riconfezionamento, che possono favorire la contaminazione del prodotto. A conferma di ciò, negli ultimi anni sono state registrate nel *Rapid Alert System for Food Products* (RASFF) alcune allerte comunitarie per la presenza di *L. monocytogenes* in ricotta salata prodotta in Italia. Le più recenti si riferiscono alla fine del 2012 e ad esse sono collegati diversi focolai di tossinfezioni alimentari anche con casi di mortalità negli USA. Per tutti questi motivi appare sempre più importante, per evitare la contaminazione del prodotto, tenere sotto controllo lo stato igienico-sanitario delle superfici di lavorazione. Anche il Regolamento CE 2073/2005, e successive modifiche, all'articolo 5 punto 2 precisa che *gli operatori del settore alimentare (OSA) che producono alimenti pronti, i quali possono sviluppare L. monocytogenes* devono prevedere nel loro piano di autocontrollo campionamenti *dalle aree di lavorazione e dalle attrezzature per la ricerca di L. monocytogenes*. A seguito di queste considerazioni, l'Autorità Competente, rappresentata dal Servizio Igiene degli allevamenti e delle produzioni zootecniche dell' Azienda Sanitaria Locale (ASL) della Provincia di Sassari, ha predisposto, in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, un piano di monitoraggio ambientale, al fine di verificare l'affidabilità dei piani di autocontrollo predisposti dalle aziende di produzione.

Materiali e Metodi

Dal mese di Gennaio al mese di Aprile 2014 sono stati esaminati n. 665 campioni provenienti da superfici di n. 50 caseifici della Provincia di Sassari. I prelievi venivano effet-

Correspondence: Giovanni Terrosu, Food Hygiene Unit, Laboratory of Milk Microbiology, Institute for Experimental Veterinary Medicine of Sardinia, via Vienna 2, 07100 Sassari, Italy. Tel: +39.079.2892352 - Fax: +39.079.2892324. E-mail: giovanni.terrosu@izs-sardegna.it

Key words: *Listeria monocytogenes*; Dairy plant; Environmental samples; Ricotta cheese.

Conflict of interests: the authors declare no potential conflict of interests.

Received for publication: 16 July 2014.

Accepted for publication: 25 November 2014.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License (by-nc 3.0).

©Copyright G. Terrosu et al., 2015
Licensee PAGEPress, Italy
Italian Journal of Food Safety 2015; 4:4578
doi:10.4081/ijfs.2015.4578

tuati utilizzando spugnette pre-inumidite (*sponge-bag*). I punti su cui eseguire il prelievo venivano individuati preliminarmente dal Veterinario Ufficiale in base alla planimetria dell'azienda. In ciascun caseificio, il numero dei siti di campionamento variava in base a: grandezza dello stabilimento, entità della produzione, precedenti positività, analisi del rischio. In generale il numero dei campioni variava da 6 nei piccoli caseifici a 36 nei caseifici più grandi. Venivano effettuati campionamenti nei locali di lavorazione, sia nelle superfici che entravano direttamente in contatto con l'alimento che in quelle che non venivano a contatto, sulle attrezzature e nei servizi igienici. Con una mascherina veniva delimitata una superficie di 100 cm² per ciascun sito di prelievo. La *sponge* veniva strofinata esercitando una buona pressione sia verticalmente che orizzontalmente, per almeno dieci volte per ogni senso, sulla superficie delimitata. Successivamente la *sponge-bag* veniva inserita in un sacchetto sterile e identificata tramite un numero e contemporaneamente veniva compilato un elenco con una descrizione dettagliata del punto di prelievo. I campioni venivano conservati ed inviati all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale a una temperatura compresa tra 0 e 4°C entro 24 h dal prelievo. Nel sacchetto contenente la *sponge-bag* venivano aggiunti 90 mL di *Half Fraser Broth* per la ricerca di *L. monocytogenes* con il metodo della presenza/assenza (UNI EN ISO 11290-1:2005). I ceppi identificati come *L. monocytogenes* sono stati sierotipizzati mediante antisieri (Denka Seiken Co., Tokyo, Giappone) per l'identificazione degli antigeni somatici e flagellari. Le colonie isolate sui terreni selettivi per *Listeria spp.* e che non presentavano le caratteristiche tipiche di *L. monocytogenes*

venivano sottoposte ad identificazione di tipo biochimico.

Risultati

Sono risultati positivi alla ricerca di *L. monocytogenes* n. 8 campioni (1,2%) sui 665 prelevati. I campioni positivi provenivano da n. 5 stabilimenti (10%) sui 50 sottoposti al controllo. In n. 3 caseifici veniva riscontrato n. 1 campione positivo, negli altri due erano riscontrate rispettivamente n. 3 e n. 2 positività. La presenza di *L. monocytogenes* è stata rilevata sia su superfici che venivano a contatto con l'alimento, come riportato nelle tabelle n. 1 e n. 2. Più precisamente è stato riscontrato n. 1 campione positivo sia nelle celle di stoccaggio che nella macchina sotto-vuoto, mentre risultavano positivi per *L. monocytogenes* n. 2 campioni in ciascuna delle seguenti aree: sala di confezionamento, locali di salatura e macchine spazzolatrici delle forme (Tabella 1). Sul totale dei n. 8 campioni positivi alla ricerca di *L. monocytogenes*, n. 5 campioni erano stati prelevati da superfici che venivano a contatto con l'alimento (Tabella 2). I risultati relativi alla sierotipizzazione sono riportati nella Tabella 3. I sierotipi isolati con maggior frequenza erano 1/2a e 1/2b. Tutti i ceppi di *Listeria spp.* isolati (n. 6) e non identificati come *L. monocytogenes* erano appartenenti alla specie *L. innocua*. Risultavano positivi n. 4 campioni nel locale di lavorazione formaggi, e n. 1 sia nel locale lavorazione ricotta che nella sala di confezionamento (Tabella 4).

Discussione

Il significativo numero di caseifici nei quali è stata rilevata almeno una positività per *L. monocytogenes* conferma che questo microrganismo riesce a proliferare agevolmente in

alcuni ambienti dei caseifici, sopravvivendo anche a procedure di sanificazione, che per motivi diversi possono rivelarsi inadeguate. I dati mettono in evidenza il maggior riscontro di positività in superfici che vengono a contatto con l'alimento, le quali possono quindi rappresentare una fonte di contaminazione per i prodotti lattiero-caseari. *L. monocytogenes*, come atteso, è stata isolata in quelle aree che presentano condizioni di elevata umidità e temperatura di refrigerazione come nei locali salagione, stagionatura e confezionamento; inoltre anche alcuni macchinari (lava forme e sotto-vuoto) risultavano contaminati, presumibilmente per la difficoltà nell'applicazione di procedure di sanificazione. In tutte le aziende sono stati isolati gli stessi sierogruppi, in particolare i sierotipi 1/2a e 1/2b, i quali risultano essere tra quelli più frequentemente isolati dagli ambienti di produzione, su superfici, a contatto e non, con gli alimenti. Come ci si poteva attendere, per il fatto più volte citato che *L. monocytogenes* è da considerarsi un microrganismo ambientale, dai dati della sierotipizzazione emerge che nei caseifici che presentavano più di una positività il sierogruppo identificato era lo stesso. Le positività per *Listeria spp.* sono state sempre riscontrate in quelle aree in cui il prodotto viene lavorato successivamente ad un eventuale trattamento

termico. L'identificazione di ceppi di *L. innocua* mettono in evidenza che questo microrganismo possiede caratteristiche che ne consentono la presenza negli ambienti degli stabilimenti della filiera lattiero-casearia. Il riscontro di una positività per *L. monocytogenes* in un campione veniva seguito dalla relativa notifica all'OSA da parte dell'Autorità Competente. Il Veterinario Ufficiale prescriveva quindi all'OSA l'apertura e la successiva gestione di non conformità, relativamente alle procedure contenute nel piano di autocontrollo. Veniva anche richiesto di procedere a: i) azione correttiva, consistente nella sanificazione dei locali o delle attrezzature oggetto della non conformità, dando evidenza dell'efficacia delle operazioni eseguite attraverso il risultato delle analisi effettuate a seguito di un campionamento successivo; ii) relazione scritta riportante la valutazione sulle possibili cause della non conformità, accertando che essa non possa essere derivata da eventuali modifiche dei processi produttivi non riportate negli aggiornamenti del piano di autocontrollo. Va anche ricordato che gli OSA, se necessario, sono tenuti ad effettuare studi per verificare che i criteri siano rispettati per l'intera durata del periodo di conservabilità, soprattutto se gli alimenti in questione costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*

Tabella 1. Distribuzione dei campioni positivi suddivisi per sito di prelievo.

	Campioni totali (n)	Campioni positivi (n)	Campioni negativi (n)
Locale lavorazione formaggi	255	0	255
Locale salagione	66	2	64
Locale lavorazione ricotta	71	0	71
Locale confezionamento e spedizione	48	2	46
Cella di stagionatura	164	1	163
Spazzole lavaformaggi	8	2	6
Macchina sottovuoto	6	1	5
Altro	37	0	37

Tabella 2. Distribuzione dei campioni positivi suddivisi per sito di prelievo su superfici a contatto e superfici non a contatto con l'alimento.

	Campioni totali (n)	Superfici a contatto		Superfici non a contatto	
		Campioni negativi (n)	Campioni positivi (n)	Campioni negativi (n)	Campioni positivi (n)
Locale lavorazione formaggi	255	129	0	126	0
Locale salagione	66	32	2	34	1
Locale lavorazione ricotta	71	36	0	35	0
Locale confezionamento e spedizione	48	29	2	19	0
Cella di stagionatura	164	78	1	86	0
Spazzole lavaformaggi	8	7	1	1	1
Macchina sottovuoto	6	3	0	3	1
Altro	37	3	0	34	0

Tabella 4. Distribuzione dei campioni di *Listeria innocua* suddivisi per sito di prelievo.

	Campioni (n)	Campioni positivi (n)	Campioni negativi (n)
Locale lavorazione formaggi	255	4	251
Locale lavorazione ricotta	71	1	70
Locale confezionamento e spedizione	48	1	47
Altro	374	0	374

Tabella 3. Identificazione dei sierotipi nei diversi caseifici che presentavano positività per *L. monocytogenes*.

Caseificio	Sierotipo
A	1/2a
	1/2a
	1/2b
B	1/2a
	1/2a
C	1/2a
D	1/2a
E	1/2a

(Reg. CE 2073/05 e successive modifiche, art. 3 comma 2; Commissione Europea, 2005).

Conclusioni

Come ricordato, *L. monocytogenes* è un

microrganismo che riesce a proliferare agevolmente in alcuni ambienti dei caseifici, sopravvivendo spesso anche a ripetute procedure di pulizia e sanificazione, che per motivi diversi possono rivelarsi comunque inadeguate e far sì che le superfici possano rappresentare una fonte di contaminazione per i prodotti lattiero-caseari, in particolare nelle fasi successive a eventuali trattamenti termici. Le procedure di sanificazione effettuate in seguito al manifestarsi di non-conformità si sono dimostrate, nei casi riscontrati, sempre efficaci. Infatti, il campionamento per la ricerca di *L. monocytogenes* eseguito successivamente alle azioni correttive ha dato sempre esito negativo, per cui si può affermare che i piani di autocontrollo erano strutturati in modo tale da consentire la gestione delle non-conformità con misure correttive adeguate. Un dato interessante appare il riscontro di positività per *L. innocua* in diversi caseifici, in relazione alle recenti segnalazioni di ceppi atipici di questo microrganismo, i quali presentavano geni di virulenza tipici di *L. monocytogenes*.

Bibliografia

- Comitato Nazionale Per La Sicurezza Alimentare, 2009. *Listeria monocytogenes* nei formaggi. Disponibile al sito: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_publicazioni_1150_allegato.pdf
- Commissione Europea, 2005. Regolamento della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, 2073/2005/CE e successive modifiche. In: Gazzetta Ufficiale, L 338, 22.12.2005, pp 1-26.
- ISO, 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method. Norma ISO 11290-1:1996. Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione ed., Ginevra, Svizzera.
- ISO, 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method. Norma ISO 11290-2:1998. Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione ed., Ginevra, Svizzera.
- Moreno LZ, Paixão R, Gobbi DD, Raimundo DC, Ferreira TP, Hofer E, Matte MH, Moreno AM, 2012. Characterization of atypical *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets. Res Microbiol. 163:268-71.