

Case of contamination by *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese

Sara Greco,¹ Rita Tolli,¹ Teresa Bossù,¹ Eda Maria Flores Rodas,¹ Fabiola Di Gamberardino,¹ Alessandro Di Sirio,¹ Silvia Vita,¹ Veronica De Angelis,¹ Stefano Bilei,¹ Michele Sonnessa,² Antonietta Gattuso,² Luigi Lanni¹

¹Direzione Operativa Controllo degli Alimenti, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma; ²Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy

Abstract

Following a *Listeria monocytogenes* detection in a mozzarella cheese sampled at a dairy plant in Lazio Region, further investigations have been conducted both by the competent Authority and the food business operator/dairy factory (as a part of dairy factory HACCP control). In total, 90 dairy products, 7 brine and 64 environmental samples have been tested. The prevalence of *Listeria monocytogenes* was 24.4% in mozzarella cheese, and 9.4% in environmental samples, while brines were all negatives. Forty-seven strains of *L. monocytogenes* have been isolated, all belonging to 4b/4e serotype. In 12 of these, the macrorestriction profile has been determined by means of pulsed field gel electrophoresis. The profiles obtained with *AscI* enzyme showed a 100% similarity while those obtained with *Apal* a 96.78% similarity. These characteristics of the isolated strains jointly with the production process of mozzarella cheese has allowed to hypothesise an environmental contamination.

Introduzione

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) è un microrganismo patogeno, gram positivo, che colpisce soprattutto alcune categorie di popolazione a rischio quali soggetti immunocompromessi e donne in gravidanza. La trasmissione dell'agente infettivo, per via alimentare, ha un grande impatto per la salute pubblica, sia per la severità della malattia provocata, sia per l'impatto sociale che ne consegue. Nel 2010 sono stati registrati nell'Unione europea 1601 casi di listeriosi (European Food Safety Authority, 2012).

L. monocytogenes è un patogeno molto diffuso nell'ambiente e negli alimenti di origine animale e vegetale, in grado di adattarsi a condizioni ambientali anche sfavorevoli. Tuttavia quella alimentare rimane la principale via di infezione per l'uomo (Parisi, 2012), ed il consumo di cibi ready-to-eat ha contribuito all'aumento di listeriosi nei paesi più industrializzati. Il fatto che *L. monocytogenes* sia capace di sopravvivere e moltiplicarsi anche a basse temperature, ad esempio comprese tra +2 e +4°C, rende la sua presenza negli alimenti RTE particolarmente diffusa, ed in particolare nei prodotti lattiero-caseari, nelle carni salate e salumi ed in taluni prodotti della pesca (European Food Safety Authority, 2013).

Il Regolamento (CE) 2073 del 2005 (Commissione Europea, 2005) e le successive modificazioni hanno introdotto, nel contesto legislativo di riferimento degli alimenti di origine animale, il concetto di alimento ready-to-eat su cui effettuare la ricerca e la numerazione di *L. monocytogenes*, a seconda che l'alimento costituisca o meno terreno favorevole allo sviluppo del germe. Nel caso dei prodotti lattiero-caseari, la presenza di *L. monocytogenes* può essere dovuta a diversi fattori tra cui contaminazione iniziale della materia prima (per i formaggi a latte crudo), insufficiente temperatura di pastorizzazione, contaminazione nelle fasi successive al trattamento termico previsto nel processo produttivo. *L. monocytogenes* è un germe in grado di resistere per anni nell'ambiente di manipolazione degli alimenti e sviluppare resistenza nei confronti dei comuni prodotti utilizzati per interventi di sanificazione. Tale caratteristica è agevolata dalla produzione di biofilm che *L. monocytogenes* può formare da sola od insieme ad altri germi di contaminazione ambientale (Caruso *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2006). In quest'ultimo caso, risultano essere di fondamentale importanza le procedure di pulizia e sanificazione che devono essere applicate alle diverse tipologie di superfici che, se non in grado di rimuovere completamente la matrice adesiva e protettiva dei biofilm, portano inevitabilmente a rischi di contaminazione secondaria (Cecchini *et al.*, 2011).

Nel mese di novembre 2012 un campione di mozzarella, prelevato presso un stabilimento della regione Lazio nel corso delle regolari attività di controllo ufficiale dei servizi veterinari, è stato consegnato all'IZSLT di Roma per analisi di routine risultando poi positivo per la presenza di *L. monocytogenes*. A seguito della positività sono state eseguite ulteriori verifiche sia da parte dell'autorità competente sia da parte dell'azienda produttrice nell'ambito delle azioni previste dal proprio piano di autocontrollo.

Scopo del presente lavoro è quello di presentare i risultati derivanti dall'attività analitica svolta dai laboratori su campioni di mozzarella

Correspondence: Sara Greco, Direzione Operativa Controllo degli Alimenti, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, via Appia Nuova 1411, 00178 Roma, Italy.
Tel. +39.06.79099426 - Fax: +39.06.79099330.
E-mail: sara.greco@izslt.it

Key words: *Listeria monocytogenes*, Mozzarella, PFGE, Serotypes.

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

Received for publication: 13 May 2013.

Revision received: 9 September 2013.

Accepted for publication: 10 September 2013.

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

©Copyright S. Greco *et al.*, 2014
Licensee PAGEPress, Italy
Italian Journal of Food Safety 2014; 3:1708
doi:10.4081/ijfs.2014.1708

e campioni ambientali esaminati in seguito ad un episodio di contaminazione da *L. monocytogenes*. I risultati ottenuti sono stati poi messi in relazione con una precedente positività riscontrata in autocontrollo, evidenziatasi qualche mese prima presso il medesimo stabilimento.

Materiali e Metodi

Le indagini sono state condotte per un periodo di tre mesi, su un totale di 161 campioni di cui 90 riferibili a prodotti lattiero-caseari (mozzarella n=85, primo sale n=2, ricotta n=3), 7 liquido di governo e salamoia e 64 tamponi ambientali. Sui suddetti campioni, prelevati in regime di controllo ufficiale ed autocontrollo, sono state effettuate le seguenti determinazioni: pH, a_w , *L. monocytogenes* presenza e conta per i prodotti lattiero caseari, solo *L. monocytogenes* presenza e conta sui campioni ambientali.

La determinazione del pH è stata eseguita utilizzando il metodo di riferimento MFHPB-03:2003, per l' a_w il metodo di riferimento ISO 21807:2004 (ISO, 2004); la presenza/assenza di *L. monocytogenes* è stata valutata con il metodo VIDAS LMO2 AFNOR BIO-12/11-03/04, consistente essenzialmente in un'analisi immuno-enzimatica a fluorescenza mediante lo strumento VIDAS® (bioMérieux, Marci L'Etoile, Francia), mentre per la sua numerazione il metodo di riferimento è stato ISO 11290-2:2005 (UNI, 2005). L'identificazione biochimica, per la conferma delle colonie sospette, è stata effettuata con il VITEK® 2

Compact bioMérieux. Gli isolati di *L. monocytogenes* sono stati poi sottoposti a sierotipizzazione, mediante la combinazione di metodi molecolari e siero agglutinazione.

La sierotipizzazione di *L. monocytogenes*, effettuata mediante multiplex PCR, è stata eseguita utilizzando il protocollo Doumith *et al.* (2004a), che consiste nell'identificazione di *L. monocytogenes* e nella successiva suddivisione dei tre lignaggi I, II e III, in cinque gruppi filogenetici, ciascuno correlato con i seguenti sierotipi: gruppo I.1 (sierotipi 1/2a-3a); gruppo I.2 (sierotipi 1/2c-3c); gruppo II.1 (sierotipi 4b-4d-4e); gruppo II.2 (sierotipi 1/2b-3b-7); gruppo III (sierotipi 4a-4c) (Doumith *et al.*, 2004b).

La sierotipizzazione con antisieri permette di distinguere i 12 sierotipi di *L. monocytogenes* differenziabili per l'espressione, sulla superficie cellulare, di antigeni somatici O e flagellari H. Per la conferma dei sierotipi dai sierogruppi, individuati con la metodica molecolare, si è proceduto con la sieroagglutinazione mediante il Kit Listeria Antiserum SEIKEN (Denka Seiken co. LTD, Tokyo, Giappone).

Dei 47 ceppi di *L. monocytogenes* isolati, solo 11 sono stati sottoposti a caratterizzazione molecolare, 5 isolati da mozzarelle e 6 da tamponi ambientali. La selezione è stata effettuata sulla base delle precedenti prove sierologiche e molecolari in PCR Multiplex, che hanno messo in evidenza sempre lo stesso sierotipo. Tali ceppi, sono stati poi confrontati con il ceppo precedentemente isolato da un campione di mozzarella prodotto presso lo stesso stabilimento ed analizzato nell'ambito dei controlli aziendali; tale confronto è stato effettuato mediante *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE), secondo quanto descritto nel protocollo standardizzato PulseNet *L. monocytogenes* (CDC, 2009); per il metodo è stato utilizzato un enzima di restrizione (*AscI*) ed uno standard riferibile a *Salmonella* Braenderup (H9812).

Su 4 dei ceppi suddetti, 3 provenienti da mozzarelle e 1 da campione ambientale (tampone), è stata effettuata anche la digestione con l'enzima *ApaI*, dato che, ad una prima lettura dei loro profili, questi presentavano delle differenze che tale enzima avrebbe meglio evidenziato.

Dopo la digestione, i ceppi sono stati sottoposti a corsa elettroforetica con il sistema Chef Mapper XA (BioRad Inc., Berkeley, CA, USA) a 6V/cm con un switch time da 4 a 40 s per 21 h. Il gel ottenuto è stato colorato con il GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). I profili ottenuti sono stati successivamente analizzati mediante software dedicato (Fingerprinting II®BioRad). La valutazione della similarità tra i diversi profili di macrorestrizione è stata effettuata utilizzando il coefficiente di Dice con una ottimizzazione e tolleranza dell'1%. Attraverso l'utilizzo del software è seguita poi la clusterizzazione e la costruzione del dendro-

gramma utilizzando il metodo *unweighted pair group method with arithmetic mean* (UPGMA).

Risultati

Fra i prodotti lattiero caseari, le positività sono state riscontrate solo su campioni di mozzarella. Il 24.4% dei campioni analizzati (n=90) è risultato positivo e di questi il 18.2% presentava valori di *L. monocytogenes* superiori a 100 ufc/g. Dei 64 tamponi ambientali, 6 sono risultati positivi per *L. monocytogenes* (9,4%), ma con un numero di microrganismi <10 ufc/g; le acque di salamoia e di governo sono invece risultate tutte negative. I ceppi isolati (n=47) dai prodotti lattiero caseari e dai tamponi ambientali sono risultati appartenere al medesimo sierotipo (4b/4e) e pertanto sovrapponibile al primo isolamento avvenuto su un campione di mozzarella in autocontrollo. I profili di restrizione ottenuti con l'enzima *AscI* mostrano una similarità del 98% mentre per quelli ottenuti con *ApaI* la percentuale di similarità è risultata pari al 96,78%.

Discussione e Conclusioni

Il processo di produzione della mozzarella prevede la riduzione della cagliata in piccoli pezzi che favorisce l'eliminazione del siero in eccesso; attraverso un sistema automatizzato la matrice viene trasferita nella filatrice costituita da più sezioni. In tale fase di processo il prodotto viene ulteriormente sminuzzato e posto a contatto con acqua a temperatura di 82°C cui segue, nella parte terminale della filatrice, la formazione di un'unica massa filata con temperatura di circa 60°C. Le diverse fasi di produzione a temperatura controllata, sono state individuate come punti critici del processo da sottoporre a monitoraggio continuo (CCP), in quanto volti ad eliminare o ridurre a livelli accettabili la presenza di *L. monocytogenes*, sebbene alcuni studi di processo sostengono il contrario (Rudolf e Scherer, 2001). Le successive fasi di lavorazione (formatura, rassodamento e confezionamento in liquido di governo) non possono invece fornire adeguate garanzie in caso di contaminazione di *L. monocytogenes* in quanto non sono presenti ulteriori CCP.

Nel presente caso, il riscontro di *L. monocytogenes* in campioni di mozzarella può essere attribuito ad una contaminazione di tipo ambientale post trattamento termico in quanto i medesimi sierotipi di *L. monocytogenes*, sono stati riscontrati in campioni ambientali prelevati dalla ditta in autocontrollo e verosimilmente riconducibile ad una non corretta applicazione delle procedure di pulizia e sanifica-

zione delle superfici ed ambienti di lavoro. Difatti, l'analisi dei profili PFGE ottenuti con i 2 enzimi (*AscI* e *ApaI*) ha evidenziato la presenza di una singola popolazione clonale in entrambi le tipologie di campioni (ambiente ed alimento).

La corretta applicazione delle procedure riportate nel piano di autocontrollo, la loro validazione e la verifica periodica della loro efficacia sono, come sempre, fondamentali per il controllo di processo e la sicurezza dei prodotti fabbricati. Nel presente caso sono state apportate modifiche alle procedure di pulizia e sanificazione in uso, inclusi i prodotti, che hanno permesso l'eliminazione di *L. monocytogenes*, dagli ambienti di lavorazione e la risoluzione delle non conformità rilevate in autocontrollo. Le verifiche periodiche da parte del controllo ufficiale sono poi di indispensabile ausilio al sistema di autocontrollo aziendale soprattutto nel caso in cui siano registrate non conformità nell'igiene e dei criteri di processo, di cui al Regolamento 2073/2205, come quelle riportate nel presente lavoro. Lo sviluppo e l'applicazione di metodi di laboratorio più sofisticati, PCR e PFGE ad esempio, rispetto ai microbiologici classici, sono poi di fondamentale importanza a supportare l'identificazione di eventuali non conformità non strettamente legate alle fasi di processo e, di conseguenza, ad individuare con più accuratezza le problematiche di carattere procedurale.

Bibliografia

- Caruso M, Latorre L, Botticella G, Zippone V, Palazzo L, Fraccalvieri R, Santagata G, Parisi A, 2012. Studio dell'attitudine a formare biofilm di ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da alimenti, da ambienti di lavorazione degli alimenti e da casi clinici umani. Atti del XIV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., pp. 78-9.
- CDC, 2009. Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Listeria monocytogenes* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Disponibile al sito: http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/pulsenet_listeria_protocol%20.pdf
- Cecchini S, Palombo B, Briscolini S, Panciotti M, Gattuso A, Gianfranceschi MV, Loschi AR, Blasi G, 2011. Tipizzazione genotipica e formazione di biofilm di ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati nell'industria dei prodotti di gastronomia surgelati. Risultati preliminari. Disponibile al sito: <http://spvet.it/arretrati/numero-64/001Spvet64.html>
- Commissione Europea, 2005. Regolamento della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, 2073/2005/CE. In:

- Gazzetta Ufficiale, L 338/1, 22/12/2005.
- Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P, 2004a. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 42:3819-22.
- Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P, 2004b. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect Immun* 72:1072-83.
- European Food Safety Authority, 2012. The European union summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *The EFSA Journal* 10:25-97.
- European Food Safety Authority, 2013. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011. Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. *The EFSA Journal* 11:3241.
- ISO, 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Determination of water activity. Norma ISO 21807:2004. International Standardization Organization ed., Geneva, Switzerland.
- Pan Y, Breidt F Jr, Kathariou S, 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilm to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl Environ Microb* 72:7711-7.
- Parisi A, 2012. Epidemiologia molecolare della *Listeria monocytogenes* nell'uomo e negli alimenti. In: C. Graziani, F. Mancini, I. Luzzi (eds.), VIII Workshop Nazionale Enter-net Italia. Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche. Istituto Superiore di Sanità ed., Roma, Italia, p 18.
- Rudolf M, Scherer S, 2001. High incidence of *Listeria monocytogenes* in european red smear cheese. *Int J Food Microb* 63:91-8.
- UNI, 2005. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali. Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Listeria monocytogenes*. Parte 2: Metodo per la conta. Norma UNI 11290-2:2005. Ente Nazionale Italiano di Unificazione ed., Milano, Italy.