



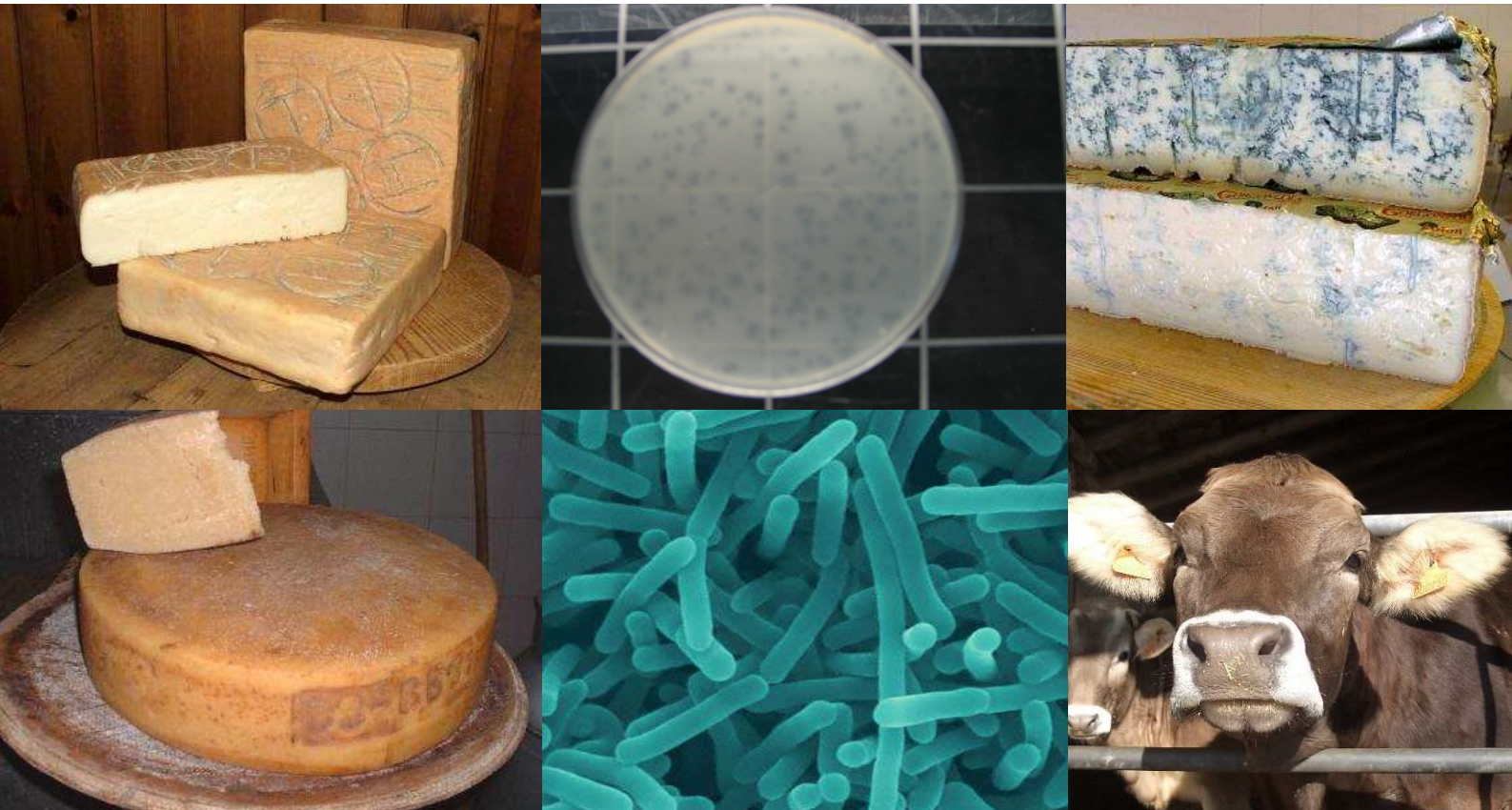
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della
Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"B. Ubertini"



GRUPPO IMPRESA®
Un network per le imprese e il territorio

www.regione.lombardia.it

DECONTAMINAZIONE BIOLOGICA DEGLI ALIMENTI DA BATTERI PATOGENI



*Quaderni della Ricerca
n 135 – ottobre 2011*

LOMBARDIA. COSTRUIAMOLA INSIEME.



Regione Lombardia
Agricoltura

Sperimentazione condotta nell'ambito del progetto di ricerca n. 1124 "Applicazione di sistemi e tecniche di biodecontaminazione alle aziende del settore alimentare (PATOBIODEC)" (Programma regionale di ricerca in campo agricolo 2007-2009 di Regione Lombardia)

Responsabile scientifico: Dott. Paolo Boni, Dott.ssa Marina Nadia Losio
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Reparto di Microbiologia
e-mail: marinanadia.losio@izsler.it

Ha realizzato le attività sperimentali:

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Reparto di Microbiologia
Via Bianchi 7/9, 25124 Brescia
Tel. 0302290544/fax 0302290556

Partner: Gruppo Impresa Finance srl
Via F. Lippi 11, 25134 Brescia
Tel. 0302306904/fax 0302306930

Testi a cura di:

Pavoni E., Cosciani Cunico E., D'Amico S., Finazzi G., Galuppini E., Losio M.N.
(IZSLER)

Fotografie a cura di:

Bertolassi R., Peli M., Spagnoli F.
(IZSLER)

Per Informazioni:

Regione Lombardia - Direzione Generale Agricoltura
U.O. Innovazione, cooperazione e valorizzazione delle produzioni
Struttura Ricerca, innovazione tecnologica e servizi alle imprese
Piazza Città di Lombardia n.1 - 20124 Milano
Tel: +39.02.6765.3790 fax +39.02.6765.8056
e-mail: agri_ricerca@regione.lombardia.it
Referente: Gianpaolo Bertoncini e Giovanna Praderio
e-mail: gianpaolo_bertoncini@regione.lombardia.it



Regione Lombardia

Agricoltura



Istituto Zooprofilattico Sperimentale della
Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"B. Ubertini"



GRUPPO IMPRESA®

Un network per le imprese e il territorio

DECONTAMINAZIONE BIOLOGICA DEGLI ALIMENTI DA BATTERI PATOGENI

*Quaderni della ricerca
n. 135 – ottobre 2011*

1. Sommario

2.	Presentazione	2
3.	Riassunto	3
4.	Abstract	5
5.	Introduzione	6
6.	Scopi	14
7.	Approccio metodologico	15
7.1	Identificazione degli stabilimenti, controllo microbiologico sui prodotti e sugli stabilimenti	15
7.1.1	Stabilimenti.....	15
7.1.2	Analisi microbiologiche.....	15
7.2	Messa a punto in laboratorio di metodiche di decontaminazione.....	16
7.2.1	Selezione dei fagi.....	16
7.2.2	Selezione dei batteri lattici.....	17
7.3	Prove sperimentali su prodotti artificialmente contaminati.....	20
7.3.1	Contaminazione dei prodotti e trattamento con batteriofagi.....	20
7.4	Prove sperimentali con disinfettanti.....	24
7.4.1	Sperimentazione con perossido di idrogeno (acqua ossigenata).....	24
7.4.2	Sperimentazione su croste di Gorgonzola con acidi organici naturali “acido lattico “.....	26
7.4.3	Prove sperimentali di modulazione dell’andamento dei patogeni	27
8.	Risultati e discussione	28
8.1	Identificazione degli stabilimenti, controllo microbiologico sui prodotti e sugli stabilimenti	28
8.2	Messa a punto in laboratorio di metodiche di decontaminazione.....	29
8.3	Prove sperimentali su prodotti artificialmente contaminati.....	33
8.4	Prove sperimentali con disinfettanti.....	40
9.	Conclusioni	44
10.	Bibliografia.....	48

2. Presentazione

Il commercio globale ha comportato una rapida e drastica mutazione nelle modalità di gestione dei mercati, con forti ripercussioni sulla produzione e sulla distribuzione dei prodotti alimentari.



Numerose aziende del settore agro-alimentare hanno dovuto introdurre, negli ultimi anni, una serie di innovazioni commerciali e tecnologiche per soddisfare le esigenze crescenti dei consumatori, che cercano sul mercato prodotti alimentari estremamente variegati. In questo quasi frenetico incrociarsi di domanda e di offerta è diventato estremamente importante garantire l'igiene e la sicurezza dell'enorme quantità di prodotti messi a disposizione. Nonostante gli sforzi degli operatori per l'implemento di piani HACCP (Hazard

Analysis and Critical Control Points) e l'attenta vigilanza del legislatore, a volte la catena della sicurezza alimentare si spezza e assistiamo a fenomeni di tossinfezioni che allarmano l'opinione pubblica.

Questo quaderno illustra i risultati del progetto di ricerca PATOBIODEC che ha valutato nuove tecnologie, da affiancare alle metodiche tradizionali di decontaminazione biologica degli alimenti, sicure per la salute dei consumatori e capaci di mantenere inalterate le proprietà organolettiche e commerciali dei prodotti.

Sono stati sperimentati nuovi metodi per prevenire o intervenire in caso di presenza dei principali patogeni (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *E. coli VTEC*, *S.aureus*, *C.botulinum*) su prodotti quali latte, burro, formaggi e salumi utilizzando batteriocine endogene (prodotte dalla microflora lattica tipica dell'alimento) e batteriofagi specifici anti-patogeno.

I ricercatori hanno condotto test anche su prodotti DOP come Grana Padano, Taleggio, Gorgonzola.

I risultati di questo progetto offrono ai produttori di alimenti fermentati suggerimenti efficaci per combattere la presenza dei patogeni già durante la maturazione e lungo tutta la shelf-life.

Giulio De Capitani

Assessore all'Agricoltura
Regione Lombardia

3. Riassunto

Negli ultimi due decenni si è assistito ad un incremento costante delle produzioni alimentari su base industriale, con un conseguente aumento della quantità di derrate alimentari e dei punti di distribuzione, soprattutto a grandi livelli di organizzazione. Questo fenomeno è nato come conseguenza degli usi e delle abitudini alimentari di una società in continua evoluzione, soprattutto per quanto riguarda la richiesta di costante disponibilità dei prodotti e l'esigenza di alimenti facilmente preparabili e consumabili. Oltretutto, in maggior parte dovuta ad un continuo input commerciale e pubblicitario, nel consumatore attuale si è instaurata la coscienza di uno stile alimentare salutare e sicuro in piena sintonia con le dinamiche veloci della vita quotidiana. Tuttavia, ad una domanda altamente esigente non corrisponde sempre un'offerta altrettanto esaustiva, in quanto periodicamente sorgono problematiche sanitarie connesse alla produzione degli alimenti, sia dovute ad episodi casuali derivati dall'elevato numero e dall'elevata varietà di prodotti, sia dovute all'inadeguatezza delle pratiche messe in atto anche in accordo ai tradizionali sistemi HACCP. Come conseguenza, si assiste all'insorgenza di episodi, anche a livello epidemico, di patologie da tossinfezione alimentare dovute in gran parte alla presenza di popolazioni batteriche e virali contaminanti le matrici alimentari.

In questo lavoro sono state valutate tecniche di biodecontaminazione riferibili all'uso di fagi e di batteriocine, oltre alla valutazione della prevalenza dei principali microrganismi (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp e *E. coli* VTEC, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum*) nei prodotti e negli stabilimenti selezionati, sia mediante controllo di prodotto che controllo ambientale. Tra le aziende, hanno partecipato quelle afferenti al Consorzio del Grana Padana DOP, Taleggio DOP, Gorgonzola DOP, 12 salumifici, 6 aziende produttrici di mascarpone e ricotta e 14 aziende produttrici di burro di montagna. E' stata inoltre valutata la cinetica di inattivazione di *Listeria monocytogenes* sulla base dell'applicazione di

disinfettanti su prodotti alimentari (formaggi lombardi DOP, burro, mascarpone e insaccati lombardi) previamente contaminati.

Le prove sono state eseguite su base sperimentale in laboratorio su prodotti provenienti dalle Aziende partner del progetto, permettendo di identificare approcci applicabili anche in sede di stabilimento. Non sono state eseguite sperimentazioni *in loco* in fase di produzione/stagionatura come conseguenza di una carenza legislativa che regolamenti le possibilità applicative direttamente sui prodotti o gli ambienti di stagionatura.

4. Abstract

In the last two decades it has been observed a constant increasing of industrial food production, with a consequent raising in amount and number of organized distribution locations. This phenomenon is due to new alimentary habits in society, and people are continuously asking for healthy and ready to eat food, available all over the year. Moreover, consumers want to eat healthy and safe food, complying with stressing and fast dynamics of modern way of life. However, these demanding requests are not always satisfied by an effective supply, as periodically new foodborne outbreaks hit the population even with fatal effects. These serious health problems are often caused by sporadic cases where food contaminations are caused by the high number of products, having high probabilities to cross over. Outbreaks are, furthermore, caused by inappropriate practices leading to mistakes even following the implementation of HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) systems. As a consequence foodborne outbreaks have pathologic effects in the population, also with epidemic spreading, caused by bacterial or viral agents contaminating the food.

The aim of this work was to identify and to set up decontamination practices in laboratory to be taken to industrial transformation lines, able to reduce the presence of pathogen microorganisms in produce. The environmental and the product's presence of the most important pathogens (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli* VTEC, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium botulinum*) in a large number of Lombard companies producing PDO (Protected Designation of Origin) cheese, dairy and sausages has been investigated. New decontamination methods using bacteriocine and bacteriophages have been tested.

5. Introduzione

Le tossinfezioni alimentari più diffuse nell'Unione Europea (UE) sono causate da batteri riferibili a *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* VTEC (*E. coli* verocitotossici) e da virus che penetrano nell'organismo attraverso il tratto gastro-intestinale, dove spesso si avvertono i primi sintomi. Alcuni di questi microrganismi, definiti "patogeni emergenti", hanno aumentato la loro diffusione negli ultimi anni come conseguenza diretta dell'incremento degli scambi commerciali, dell'aumento della ristorazione collettiva e dei grandi allevamenti intensivi. Le tossinfezioni alimentari possono derivare dall'infezione con microrganismi patogeni che colonizzano le mucose intestinali, oppure dall'ingestione di alimenti contaminati da questi patogeni, o dalla presenza nei cibi di tossine di origine microbica (1). Ogni anno queste patologie colpiscono oltre 380.000 cittadini dell'UE.

Recentemente, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) e il Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (ECDC) hanno pubblicato <http://www.efsa.europa.eu/it/press/news/zoonoses110322.htm> la relazione annuale sulle zoonosi e sulle epidemie di origine alimentare nell'Unione Europea per il 2009 (2). Dalla relazione emerge come, a fronte di una diminuzione dei casi di *Salmonella* nell'uomo pari al 17%, la campylobatteriosi è stata ancora la malattia zoonotica segnalata con maggior frequenza nell'uomo, in leggero aumento nel 2009 con 198.252 casi rispetto ai 190.566 del 2008 (+ 4%).

Le infezioni da *Listeria monocytogenes* nell'uomo sono invece aumentate del 19% rispetto al 2008, con 1.645 casi confermati. Dal 2000 ad oggi si è osservato in vari paesi dell'UE un aumento dei casi di listeriosi.

Escherichia coli è uno dei principali batteri della flora intestinale. Non provoca malattie e negli alimenti è considerato indice di contaminazione fecale. Tra gli stipiti che hanno acquisito carattere di virulenza, e che pertanto possono causare malattia anche fatale nell'uomo, si segnalano gli *E. coli* enteroemorragici

produttori di vero tossine (VTEC), cui sono attribuibili 3.573 casi nell'uomo nel 2009, in leggero aumento (9%) rispetto al 2008.

Il pacchetto legislativo UE in materia di igiene dei prodotti alimentari stabilisce i requisiti igienici per produttori e operatori del settore alimentare e fissa norme per l'organizzazione dei controlli ufficiali su carne fresca, latte e altri cibi. Il quadro per la sorveglianza e il controllo delle tossinfezioni alimentari è contenuto nella legislazione UE sulle zoonosi (Direttiva (CE) 2003/99). Il regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari definisce i criteri di sicurezza alimentare per alcuni importanti batteri, tossine e metaboliti di origine alimentare, tra cui la *Listeria monocytogenes*, presenti in alimenti specifici. Più precisamente, la normativa prevede che i patogeni in grado di costituire un rischio per l'uomo siano assenti dagli alimenti, ad eccezione della *Listeria monocytogenes*, per la quale è stabilito il livello massimo accettabile di 100 Unità Formanti Colonie UFC/ml (o grammo) per gli alimenti pronti al consumo senza ulteriori trattamenti. In ultima analisi, la sicurezza degli alimenti deve essere garantita da un approccio preventivo che preveda la progettazione di processo e prodotto e l'applicazione di standard industriali come le buone pratiche igieniche (GHP), di fabbricazione (GMP), i principi dell'analisi del rischio e i punti critici di controllo (HACCP). Le moderne tecniche di produzione e i programmi di monitoraggio non sono tuttavia in grado di controllare efficacemente il problema delle tossinfezioni alimentari. Pertanto, negli ultimi anni si è cercato di individuare nuove metodiche e tecnologie con l'obiettivo di aumentare i livelli della sicurezza alimentare da applicare alla filiera produttiva.

L'impiego negli ultimi anni di metodiche d'analisi molecolari, sia di *screening* che di diagnosi, affiancate a quelle tradizionali tuttora ufficiali, ha permesso di accorciare notevolmente i tempi di risposta e quindi di rendere più fluida la distribuzione sul mercato soprattutto dei prodotti freschi con un elevato tasso di deperibilità. Inoltre, essendo questi metodi altamente specifici per la rilevazione del genoma (DNA e/o RNA) degli organismi patogeni, si è potuto potenziare lo

sforzo per la ricerca dei microrganismi non solo sul prodotto finito, ma anche in tutte le varie fasi di preparazione, produzione e distribuzione che sono comprese nell'intero processo di analisi del rischio associato ai punti critici (HACCP) di ciascun produttore nella catena alimentare. Infine, la sorveglianza effettuata anche con queste metodiche, molto più sensibili rispetto a quelle della microbiologia tradizionale, ha permesso di alzare la soglia di attenzione per poter stimare un livello di rischio, e quindi di pericolo, in anticipo rispetto a quei valori di contaminazione alimentare che comporterebbero l'emanazione delle allerte europee.

Infatti, negli ultimi anni sono state emanate allerte europee nei confronti di alcuni lotti di formaggio tra i quali Taleggio DOP, Gorgonzola DOP e salumi, che contenevano quantità di *Listeria monocytogenes* non conformi (09.03.2005 - Segnalazione con allerta 106/2005 riguardante salame proveniente dall'Italia, contaminato con *L. monocytogenes*; 20.12.2005 - Segnalazione con allerta 275/2005 riguardante formaggio di importazione italiana contenente *Listeria monocytogenes* oltre il valore limite; 25.08.2006 - Comunicazione riguardante formaggio del tipo Gorgonzola contaminato con *Listeria monocytogenes*; 26.11.2010 Gorgonzola proveniente dall'Italia contaminato da *Listeria monocytogenes* (presente/25g); 1.12.2010. Gorgonzola proveniente dall'Italia contaminato da *Listeria monocytogenes* (>10 UFC/g in 1 su 5 unità campionarie)). Su queste basi, obiettivo di questo progetto è stato di valutare tecniche alternative di biodecontaminazioni da applicarsi agli alimenti e/o agli ambienti di produzione, tali da affiancare le normali prassi igieniche, permettendo di ottenere un più elevato livello di sicurezza alimentare.

Una tecnica alternativa di biodecontaminazione è rappresentata dall'uso dei batteriofagi come "biodecontaminanti", con lo scopo di contrastare la presenza di specifici batteri indesiderati (3). Tale azione competitiva contribuisce a mantenere le concentrazioni dei patogeni a livelli più contenuti soprattutto all'interno di quei prodotti tipici italiani che prevedono fasi di preparazione ed ambienti di

stagionatura non propriamente asetti, ma che costituiscono la caratteristica essenziale della loro unicità.

I batteriofagi, o più comunemente “fagi”, sono virus che replicano soltanto all’interno di cellule batteriche quali loro specifici ospiti. Essi, infatti, infettano e distruggono il batterio ospite, determinando così il loro effetto antimicrobico. L’estrema specificità dei batteriofagi nei confronti del patogeno bersaglio li rende candidati ideali per le applicazioni volte ad aumentare la sicurezza dell’alimento durante i processi produttivi. Negli ultimi anni si è sempre più diffusa la consapevolezza dell’effettivo potenziale applicativo dei batteriofagi nell’industria alimentare, da impiegare nell’inibizione dello sviluppo dei microrganismi indesiderati grazie soprattutto al carattere di sicurezza e di innocuità dei batteriofagi nei confronti delle cellule animali ed alla loro spiccata specificità di ospite di infezione. E’ stato ad esempio ampiamente dimostrato il loro ruolo nel prevenire o ridurre le infezioni negli allevamenti (terapia fagica), decontaminare le carcasse e altri prodotti crudi come frutta e verdura, disinfettare utensili e superfici, estendere la shelf-life dei prodotti alimentari comportandosi da antibatterici naturali sia nei confronti di patogeni che di batteri deterioranti. Il loro impiego consentirebbe inoltre la riduzione dell’uso di molti dei presidi chimici attualmente usati, verso i quali è sempre più comune lo sviluppo di antibiotico-resistenza da parte degli stessi microrganismi. Significativa è l’autorizzazione della US Food and Drug Administration (FDA) del 2006 per il loro utilizzo in prodotti a base di carne e precisamente su cosce, petti e carcasse di pollo per contrastare la presenza di *Salmonella* spp (4). Sempre nell’agosto del 2006, la FDA ha approvato l’uso di un preparato composto da un pool di sei diversi batteriofagi purificati (LMP 102) da poter utilizzare come agente antimicrobico nei confronti della *Listeria monocytogenes* all’interno dei cibi ready to eat (RTE), nella carne e nel pollame. Il preparato è in grado di agire nei confronti di 170 diversi ceppi di *Listeria monocytogenes*; studi compiuti su animali hanno dimostrato che il suo impiego non determina problemi per la salute del consumatore (5). Questo documento segna la prima volta in cui la FDA ha

regolamentato l'uso dei batteriofagi nei prodotti alimentari, classificandoli come additivi. Nell'industria alimentare, l'EBI (European Bioinformatics Institute) Food Safety ha recentemente permesso la commercializzazione del Listex™ P100 per controllare la *Listeria monocytogenes* nella carne e nei formaggi. Questo prodotto contiene il batteriofago P100 (6).

Sono comunque già commercialmente disponibili altri prodotti basati sull'utilizzo di batteriofagi vivi:

- PhageBioderm (www.phageinternational.com)
- Bacteriophagum Intestinalis Liquidum (www.biochimpharm.ge)
- Pyobacteriophagum Liquidum (www.biochimpharm.ge) (7)
- Terapia fagica (www.wouncarecenter.net)

L'innocuità dei fagi è riportata anche nei recenti documenti dell'EFSA "QPS 2009" e "The use and mode of action of bacteriophages in food production"(8) dove si cita, tra l'altro, che "i batteriofagi possono costituire un'efficace alternativa per l'eliminazione di specifici patogeni alimentari" (bacteria eating viruses known as bacteriophages, could be an effective way of eliminating specific food pathogens) (9). I fagi, quindi, sono ritenuti generalmente *safe* (sicuri) a meno che non siano in grado di trasferire geni di virulenza o di antibiotico-resistenza dei microrganismi *target* in virtù di fenomeni di trasduzione genica (trascinamento). Questa caratteristica è tuttavia propria solo di una parte dei fagi a DNA. Da questi due documenti emerge come possibile problematica l'impiego di fagi "temperati" a DNA in virtù del meccanismo della trasduzione. Lo stesso documento QPS dell'EFSA cita, tuttavia, che le caratteristiche di sicurezza dei fagi dovrebbero essere valutate "caso per caso" anche nei fagi a DNA al fine di poter escludere rispettivamente il trasferimento genico, la patogenicità e l'antibiotico resistenza. Da queste considerazioni emerge quindi come le problematiche connesse all'utilizzo dei fagi siano ancora aperte e come quindi sia necessario potenziare l'approccio scientifico e sperimentale al fine di aumentare la sostenibilità scientifica finalizzata ad un loro utilizzo pratico.

Un'altra tecnica alternativa di biodecontaminazione è rappresentata dall'utilizzo di popolazioni lattiche biocompetitrici o di prodotti da esse derivanti, quali le batteriocine. L'effetto di inibizione alla crescita e l'attività listericida è stata attribuita a diversi ceppi di batteri lattici che sono in grado di influenzare la crescita del patogeno con diversi meccanismi d'azione.

Il primo prende il nome di Jameson effect, ed è descritto ampiamente in letteratura (10): la popolazione che per prima raggiunge la fase stazionaria di crescita blocca la popolazione competitor impedendole di aumentare la concentrazione. I batteri lattici presenti in concentrazione elevata raggiungono molto velocemente la loro fase stazionaria di crescita impedendo al microrganismo patogeno, verosimilmente a concentrazioni molto inferiori nel prodotto, di crescere.

La seconda via, anch'essa documentata da studi scientifici, è quella che valuta l'effetto dei metaboliti dei batteri lattici nei confronti di diverse popolazioni batteriche. I batteri lattici, oltre a produrre attraverso la via fermentativa acidi organici come l'acido lattico e l'acido acetico, che sono già essi stessi inibenti della crescita microbica dei microrganismi competitori, producono svariati polipeptidi che generalmente prendono il nome di batteriocine. Batteri come il *Lactococcus lactis* e *Lactococcus cremoris* producono un antibiotico naturale, la nisina, ammesso nella massa degli alimenti per il trattamento conservativo. La nisina è attiva principalmente sui clostridi nei confronti dei quali svolge attività battericida e sporicida; altri autori hanno isolato dagli alimenti ceppi di batteri lattici (*Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei*) caratterizzati da un forte effetto antimicrobico nei confronti di *L. monocytogenes* e caratterizzati da scarsa attività proteolitica che potrebbe danneggiare il prodotto alimentare (11). Anche i batteri definiti di nuova generazione, come i *Carnobacterium*, producono batteriocine con spiccata attività listericida, valutazione effettuata su matrici quali il salmone, (12) e il latte (13). In alcuni tipi di formaggi la microflora non patogena né alterante agisce positivamente ostacolando la moltiplicazione dei clostridi. Fino a poco tempo fa si riteneva che questa microflora fosse costituita essenzialmente da batteri lattici (*Lactobacillus*,

Lactococcus, *Micrococcus*, *Pediococcus*) ma di recente si è scoperto (14) che altri generi come i *Bacillus* e i *Paenibacillus* sono in grado di inibire la crescita del *Clostridium botulinum* producendo dei polipeptidi resistenti sia alle alte temperature sia ai pH acidi. Questi polipeptidi avrebbero effetto antimicrobico anche nei confronti di *E. coli*.

I processi tecnologici per la standardizzazione dei prodotti lattiero-caseari, al fine di avere prodotti simili per resa, aspetto e caratteristiche organolettiche, hanno incoraggiato l'utilizzo di starter microbici prodotti con ceppi di batteri lattici (generalmente *Lactobacillus delbrueckii* sottospecie *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*). L'utilizzo di elevate concentrazioni di questi microrganismi potrebbe inibire lo sviluppo di altre specie e generi microbici in grado di portare maggior sicurezza al prodotto alimentare. Infatti, la diversità delle popolazioni presenti nel latte aumenterebbe la probabilità di trovare ceppi produttori di sostanze antimicrobiche. Un'ipotesi tecnologica potrebbe essere l'utilizzo di ceppi controllati che non alterino i prodotti organoletticamente ma che fungano da antimicrobici naturali.

Infine, poiché gli alimenti RTE occupano una posizione predominante all'interno delle norme comunitarie che costituiscono il "Pacchetto igiene", come esplicitamente sottolineato dal Reg. 2073/2005CE modificato ed integrato dal Reg. 1441/2007CE relativamente ai criteri di sicurezza alimentare applicabili per *Listeria monocytogenes*, la responsabilità del produttore non si limita alla garanzia di assenza del patogeno al termine del ciclo di produzione, ma definisce anche il limite di tale patogeno nell'alimento al momento del consumo, pari a 100 UFC/g o ml. *Listeria monocytogenes* è, infatti, un microrganismo in grado di sopravvivere negli ambienti di lavorazione e sulle attrezzature utilizzate nel processo produttivo degli alimenti qualora non siano previste, e correttamente applicate in stabilimento, delle procedure di pulizia e sanificazione accurate. Pertanto tale microrganismo risulta essere, tra quelli potenzialmente patogeni per l'uomo, il più insidioso responsabile di ricontaminazione. Esso, infatti, essendo ubiquitario, persiste sugli strumenti di lavorazione e nei locali di produzione di

caseifici, salumifici, mense, aziende per la macellazione e il sezionamento e tutto ciò che in generale concerne la lavorazione e la distribuzione dei prodotti alimentari. Inoltre, è stata descritta in letteratura anche la presenza di *Listeria monocytogenes* durante fasi del processo produttivo dei vegetali quali la cernita, la mondatura, il porzionamento e il confezionamento (15). Infine, *Listeria monocytogenes* è in grado di moltiplicarsi anche alle temperature di refrigerazione e ad elevate concentrazioni di sale (fino all'11% di NaCl).

Sulla base di questi presupposti, è stata valutata l'efficacia del'acido lattico e di un disinfettante a base di perossido di idrogeno (acqua ossigenata), stabilizzato da un polialcol e privo di additivi tossici come il nitrato d'argento. Per questo disinfettante è stata verificata la capacità di diminuire la concentrazione di *Listeria monocytogenes* su croste di Gorgonzola e di altri formaggi, sulla superficie esterna di un salame e su superfici ambientali.

6. Scopi

Il progetto si è proposto l'obiettivo di dare sostenibilità scientifica alla possibile applicazione di tecniche di biodecontaminazione riferibili sostanzialmente all'uso di batteriofagi e batteri lattici come modulatori degli andamenti dei patogeni rispettivamente per infezione e mediante l'elaborazione di batteriocine per il contenimento delle contaminazioni batteriche in differenti tipologie di matrici alimentari. Al pari di quanto consentito per i prodotti a base di carne soggetti a esportazione USA, si è inoltre voluto valutare l'utilizzo di tipologie determinate di disinfettanti (trattamenti letali) su alimenti ready to eat. Tali trattamenti non sono stati proposti come alternativi alle normali pratiche igienico sanitarie normalmente messe in atto negli stabilimenti di produzione ma sinergici alle stesse, al fine di ovviare alle limitazioni presenti nei tradizionali, seppur correttamente applicati, sistemi HACCP, che spesso possono essere causa di importanti episodi di malattia con ricadute sia di ordine sanitario che economico.

Stanti, infatti, le attuali lacune legislative circa l'utilizzo di fagi e batteriocine nell'industria alimentare, obiettivo del progetto è stato di fornire sostenibilità scientifica a supporto del loro utilizzo, fatte ovviamente salve le necessarie valutazioni di sicurezza. A fronte, infatti, di un costante incremento delle produzioni alimentari su base industriale e di una domanda più esigente, dovuta a una mutata coscienza del consumatore, che richiede prodotti sempre più salutari e sicuri, non corrisponde sempre una risposta esaustiva, come documentato dal fatto che periodicamente si assiste all'insorgenza di problematiche sanitarie connesse alla produzione di alimenti, solo in parte dovute ad episodi casuali e, più frequentemente, dovute all'inadeguatezza delle prassi igieniche messe in atto, pur in accordo ai tradizionali sistemi HACCP.

Il progetto si pone quindi l'obiettivo di identificare e di mettere in atto prassi di decontaminazioni, non alternative, ma sinergiche a quelle tradizionali che, se applicate in fase di trasformazione, possono essere in grado di modulare e mantenere sotto controllo la presenza di microrganismi patogeni.

7. Approccio metodologico

7.1 Identificazione degli stabilimenti, controllo microbiologico sui prodotti e sugli stabilimenti

7.1.1. Stabilimenti

Negli stabilimenti afferenti ai Consorzi di tutela del Grana Padano DOP, del Taleggio DOP e del Gorgonzola DOP, in dodici salumifici, in sei aziende produttrici di mascarpone e ricotta, in quattordici aziende produttrici di burro di montagna ubicati in Valle Camonica e Valle Trompia, produttori anche di formaggio Silter, sono stati effettuati campionamenti sui prodotti, così come negli ambienti di lavorazione. In accordo a quanto previsto, in ogni stabilimento sono stati considerati tre lotti e per ogni lotto almeno cinque prodotti. I tamponi ambientali sono stati effettuati con spugnette in grado di campionare superfici sino a 100 cm².

7.1.2. Analisi microbiologiche

L'attenzione è stata in particolare rivolta alla ricerca di *Listeria monocytogenes* per quanto concerne crosta e pasta di Taleggio DOP e Gorgonzola DOP, crosta di Grana Padano DOP, impasto e involucro dei salumi; di *Salmonella* spp per i prodotti a base di carne; *Staphylococcus aureus* per i formaggi freschi e salumi; *Escherichia coli* O157:H7 in burro artigianale e salumi ed infine *Clostridium botulinum* in ricotta e mascarpone. La pressione ambientale dei patogeni negli stabilimenti è stata monitorata mediante esecuzione di tamponi ambientali (su superfici di circa 100 cm²) in una media di 25 punti per ogni stabilimento in esame. Il controllo microbiologico è stato condotto inizialmente mediante utilizzo di metodiche molecolari basate sia su tecniche PCR (Polymerase Chain Reaction) che su tecniche Real Time PCR volte all'individuazione del DNA batterico.

Nello specifico, i campioni sono stati arricchiti in terreno colturale rappresentato rispettivamente per i 5 patogeni dal terreno previsto dai metodi ISO (International organization for Standardization) di riferimento e quindi incubati per 24 ore a 37°C. Si è quindi proceduto all'estrazione di DNA batterico utilizzando un kit commerciale rispettivamente per patogeni Gram positivi (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e Gram negativi (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. *E. coli* VTEC).

Le reazioni Real time PCR sono state condotte utilizzando lo strumento "Real time PCR (AB7300 System) mentre le reazioni PCR end point sono state condotte sullo strumento AB9700.

Per la ricerca di *Clostridium botulinum* si è proceduto con il solo metodo colturale, seguendo le indicazioni AOAC (Association of Official Analytical Chemists; www.aoac.org).

Tutti i campioni risultati positivi alla prova molecolare di screening sono stati sottoposti ad esame microbiologico colturale utilizzando le metodiche ISO di riferimento. I ceppi isolati sono stati sottoposti a ribotipizzazione automatica (Riboprinter, Qualicon) ed i risultati elaborati mediante software Bionumerics al fine della loro caratterizzazione molecolare.

7.2 Messa a punto in laboratorio di metodiche di decontaminazione

Al fine di disporre di strumenti in grado di valutare le caratteristiche funzionali di fagi, batteriocine e batteri lattici da impiegarsi nelle fasi sperimentali, sono state inizialmente messe a punto e standardizzate in laboratorio tecniche riferibili a coltivazione di fagi e verifica sulla produzione di batteriocine.

7.2.1. Selezione dei fagi

Differenti ceppi batterici provenienti dall'ATCC (American Type Culture Collection) sono stati utilizzati per l'isolamento, la propagazione e la valutazione

della capacità dei batteriofagi di infettare la cellula batterica ospite. Tutti i ceppi sono stati incubati a 37°C in terreno di coltura Luria-Bertani (LB).

Ciascuna aliquota di brodocoltura batterica è stata addizionata al liquido di lavaggio proveniente dal caseificio ed incubata a 37°C per una notte. La miscela è stata quindi trattata con il 10% di cloroformio per lisare le cellule batteriche ed, in seguito a centrifugazione, il surnatante è stato filtrato con filtri a scalare da 0,8 a 0,2 µm al fine di ottenere una soluzione contenente unicamente fagi. Questi ultimi sono stati poi messi in liquido di mantenimento con MgSO₄. Lo screening dei lisati è stato effettuato attraverso una procedura modificata della tecnica tradizionale “Double-layer plaque”. In breve, 500 µl di una specifica coltura batterica precedentemente coltivata, pellettata e risospesa in soluzione fisiologica sterile, sono stati addizionati a 6 ml di soft agar liquefatto e poi raffreddato a 42°C; la miscela è stata quindi distribuita su due piastre di terreno solido (LB agar). Dopo la solidificazione del soft agar a temperatura ambiente, sono stati distribuiti su ciascuna piastra sei spot da 30 µl ciascuno della sospensione di batteriofago. Come controllo negativo, al centro di ciascuna piastra sono stati depositi 30 µl di PBS sterile. Le piastre sono state incubate a 37°C per una notte e poi esaminate per la presenza di placche di lisi.

Ciascun lisato è stato purificato come precedentemente descritto (16). Per analizzare la loro morfologia, i batteriofagi sono stati analizzati attraverso microscopia elettronica (17).

7.2.2. Selezione dei batteri lattici

Isolamento dei batteri lattici dalla matrice

Campioni di formaggio, prelevati in diversi momenti della stagionatura, sono stati sottoposti a omogeneizzazione e successivo inoculo in piastre utilizzando due terreni di coltura diversi: MRSA (Man Rogosa Sharpe Agar) e M17 agar per l'isolamento rispettivamente di lattobacilli e lattococchi, componenti la flora

lattica del prodotto (18). I ceppi isolati sono stati allestiti in fiale alla concentrazione di 10^7 UFC (Unità Formanti Colonia)/fiala e conservati a -80°C in brodo MRS e glicerolo al 20%.

Caratterizzazione dei ceppi

Tutti i ceppi isolati sono stati sottoposti a caratterizzazione molecolare mediante ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), tecnica di elezione per la caratterizzazione dei batteri lattici (19, 20, 21). Per l'allineamento locale delle sequenze in formato FASTA, è stato utilizzato il software BLAST2 (Basic Local Alignment Search Tool) e le sequenze sono state confrontate con quelle depositate in GenBank.

Oltre alla tecnica ARDRA, i ceppi sono stati sottoposti anche alla caratterizzazione genotipica mediante ribotipizzazione automatica. Questa metodica, oltre che identificare il ceppo batterico, permette una classificazione più dettagliata determinando anche i sottogruppi di caratterizzazione o ribogruppi (22; 23, 24). L'analisi è stata eseguita mediante lo strumento RiboPrinter (DuPont-Qualicon Ltd, Wilmington, DE).

Produzione di batteriocine

E' stata valutata la produzione da parte di ciascun ceppo di batteriocine ad azione litica verso i seguenti batteri patogeni: *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115); *Salmonella Enterica subs. Enterica* (id:230747); *Salmonella* Derby (id:259473/3); *Salmonella* Thyphimurium (ATCC 6994); *Salmonella* Napoli (337144/2007); *Salmonella* Enteritidis (id:240752/2); *Escherichia coli* O157:H7 (IZS 675); *Staphylococcus aureus* (IZSLER 542).

La metodica ha previsto le seguenti fasi:

1) Coltivazione per una notte sia della specie lattica che di quella patogena rispettivamente in MRS Broth e BHI a 37°C (25).

- 2) Preparazione di piastre di MRS Agar con cinque fori equidistanti.
- 3) Trasferimento nei pozzetti di 35 μ l di brodo coltura del batterio lattico e di controllo positivo (Nisina 10 μ g/ml senza e con EDTA a pH 8 rispettivamente per i batteri Gram + e Gram -).
- 4) Incubazione delle piastre a 30°C.
- 5) Preparazione di capsule Petri contenenti 9 ml di PCA (Plate Count Agar) addizionati di 1 ml di brodo coltura del batterio patogeno.
- 6) Incubazione per una notte a 37°C.
- 7) Lettura delle piastre e verifica della presenza di alone d'inibizione della crescita del patogeno (26, 27, 28).

Saggio di adesività dei batteri lattici al substrato cellulare

Per questa prova sono state utilizzate cellule CaCo-2 (Human Adenocarcinoma) in grado di differenziarsi e riprodurre le condizioni fisiologiche dell'ospite *in vivo*. La metodica ha previsto le seguenti fasi:

- 1) allestimento in soluzione fisiologica di diluizioni seriali in base 10 del batterio lattico fatto crescere per 24-48 ore a 37°C in 10 ml di MRS brodo;
- 2) semina delle diluizioni di batterio lattico su cellule CaCo-2, private del loro terreno di crescita, e in seguito lasciato a contatto per 1 ora e 30 minuti a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂;
- 3) al fine di disporre del conteggio della quantità reale di batterio lattico, prima dell'inoculo, è stata effettuata una titolazione;
- 4) le cellule Caco-2, staccate utilizzando 500 μ l di tripsina, sono state in seguito aggiunte ad una soluzione di 4 ml di fisiologica e 500 μ l di siero;
- 5) successivamente sono state seminate per inclusione aggiungendo, in una piastra vuota, 1 ml delle medesime a 13 ml di MRS agar precedentemente sciolto;
- 6) le piastre sono state incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ per tre giorni;
- 7) infine, è stata effettuata la conta delle colonie formatesi nelle piastre, prima e

dopo il contatto dei lattici alle Caco-2 per verificare l'adesività batterica alle cellule (25).

7.3 Prove sperimentali su prodotti artificialmente contaminati

7.3.1. Contaminazione dei prodotti e trattamento con batteriofagi

Alimenti

La prova ha preso in esame i seguenti alimenti:

- Latte parzialmente scremato a lunga conservazione (utilizzato come modello sperimentale semplificato rispetto al prodotto finito)
- Formaggio fuso;
- Taleggio DOP
- Gorgonzola DOP
- Grana Padano DOP
- Formaggio Silter

Fagi

Per la prova è stato selezionato un fago isolato (paragrafo 7.2.1), con DNA a doppio filamento e denominato IZS1. Per la prova relativa al Grana Padano è stato impiegato un fago a RNA denominato MS2.

Ceppi batterici:

Gli alimenti in esame sono stati contaminati con *Listeria monocytogenes* ceppo IZSLER 129695/4 (id. Riboprinter DUP 1038, da ceppo batterico, anno: 2009). Un'aliquota da 1 ml, è stata opportunamente scongelata e diluita in 9 ml di brodo BHI (Brain Heart Infusion). La soluzione di Batteriofago IZS1 è stata ottenuta infettando una coltura di *Listeria monocytogenes* in fase di crescita esponenziale. Dopo 48 ore a 30°C la produzione è stata filtrata per ottenere il batteriofago e

successivamente titolata come di seguito descritto. Per la prova relativa al Grana Padano è stato utilizzato il ceppo di *E. coli* specifico per il fago selezionato.

Modalità di contaminazione

— Latte parzialmente scremato a lunga conservazione:

la prova è stata suddivisa in tre test, usando concentrazioni diverse del patogeno e del fago specifico, al fine di valutare il limite massimo della sua capacità d'azione nei confronti di *Listeria monocytogenes*. Sono state effettuate diluizioni seriali in base 10 di *Listeria monocytogenes* ed 1 ml di ciascuna di esse è stato poi inoculato in 9 ml di latte. In ciascuna provetta del campione trattato, è stato inserito 1 ml di soluzione di Batteriofago IZS1.

Nel primo test è stato usato un titolo di *Listeria monocytogenes* pari a 10^8 UFC/ml e di IZS1 pari a 10^{10} UFP/ml.

Nel secondo test, *Listeria monocytogenes* pari a 10^5 UFC/ml e IZS1 pari a 10^5 UFP/ml.

Nel terzo, *Listeria monocytogenes* pari a 10^3 UFC/ml e IZS1 pari a 10^3 UFP/ml.

— Formaggio fuso:

nella seconda parte della sperimentazione si è voluto valutare l'attività del Batteriofago IZS1 contro *Listeria monocytogenes* utilizzando come matrice alimentare porzioni di formaggio fuso. Ogni singola porzione (20 g circa) è stata immersa in una soluzione (400 ml) di *Listeria monocytogenes* pari a 10^4 UFC/ml per 6 minuti. Dopo aver lasciato asciugare a temperatura ambiente, la metà delle porzioni di formaggio fuso è stata immersa in una soluzione (200 ml) di Batteriofago IZS1 5×10^8 UFP/ml per 3 minuti; le restanti porzioni (campioni non trattati) non hanno subito tale trattamento e sono servite da campioni di controllo. Le porzioni di formaggio fuso così ottenute sono state confezionate e conservate a 5°C.

— Taleggio DOP:

come terza prova sono state usate 3 forme di Taleggio DOP (formaggio a pasta cruda, stagionato 35-40 gg), contaminate per immersione (10-15 minuti) con una

sospensione di *Listeria monocytogenes* pari a 10^7 UFC/ml. Una volta estratte, sono state lasciate ad asciugare all'aria per 10-15 minuti, in modo da ottenere una concentrazione superficiale di *Listeria monocytogenes* pari a circa 10^5 UFC/cm². Successivamente, la metà delle forme è stata irrorata con una soluzione di Batteriofago IZS1 (300 ml circa), con un titolo pari a 10^7 UFP/ml. Dopo averle lasciate asciugare all'aria, tutte le forme sono state accuratamente re-incartate e poste in frigo termostato a 5°C.

— Gorgonzola DOP:

tre croste di Gorgonzola DOP sono state trattate analogamente a quanto descritto per il Taleggio DOP

— Grana Padano DOP:

poiché da prove sperimentali riportate nell'apposita sezione del sito www.ars-alimentaria.it era emerso come tutti i patogeni venissero rapidamente inattivati nella fase di riscaldamento della caldaia, la prova è stata eseguita con il solo ceppo *E. coli* 0157:H7 al fine di valutare la possibile azione inibente del fago MS2. *E. coli* è stato sperimentalmente immesso in caldaia alla concentrazione di 10^3 UFC/ml mentre il fago è stato impiegato anch'esso alla concentrazione di 10^3 UFP/ml.

Valutazione analitica

In tutte le prove, il titolo di *Listeria monocytogenes* è stato calcolato eseguendo delle diluizioni seriali in base 10 del ceppo batterico. Successivamente sono stati piastrati 100 µl di ciascuna diluizione su piastre di ALOA agar (Agar Listeria Ottaviani Agosti) e, dopo averle incubate in aerobiosi per 48 ore a 37°C, si è proceduto alla numerazione di *Listeria monocytogenes* per ricavarne il titolo iniziale. Il titolo è stato inoltre calcolato sia sui campioni trattati, che sui campioni non trattati (controllo positivo) poi espresso in UFC/ml o rapportato alla superficie presa in esame (UFC/cm²). Per ottenere il titolo del Batteriofago IZS1, per ciascun campione trattato, si è proceduto con la diluizione seriale in base 10 della soluzione in esame. Successivamente 1 ml di ciascuna diluizione è

stato messo a contatto per 45 minuti con 100 µl di pellet di *Listeria monocytogenes* e, al termine dell'incubazione, ciascuna diluizione è stata piastrata su una piastra di PCA agar (Plate Count Agar). Le piastre così ottenute sono state incubate a 30°C per 48 ore; infine si è proceduto alla determinazione del titolo virale contando il numero di placche di lisi formatesi per ciascuna diluizione, esprimendo quindi il titolo del fago in UFP/ml o UFP/ cm².

Per quanto riguarda la prima prova, condotta su latte parzialmente scremato a lunga conservazione in tre test separati, i campionamenti sono stati eseguiti secondo il prospetto riportato in Tabella 1, 2, 3 (paragrafo 8.3). Le analisi dei prelievi al tempo zero, dopo 12 ore e dopo 24 ore sono state eseguite secondo la metodica: “Numerazione di *Listeria monocytogenes* su piastre di ALOA agar incubate in aerobiosi a 30°C per 48 ore”.

Nella seconda prova, effettuata su formaggio fuso, per ogni singolo campionamento è stata prelevata una porzione di campione trattato col Batteriofago IZS1 e una di campione non trattato, per poter così valutare correttamente l'attività del fago nei confronti di *Listeria Monocytogenes*. I campioni, 20 g circa ciascuno, sono stati omogeneizzati in 40 ml di soluzione APT (Acqua Peptonata Tamponata) al 6% in Tween® 80 tramite l'utilizzo di uno stomacher. I campionamenti, oltre che al tempo zero, sono stati effettuati dopo 12 e 24 ore (T₁ e T₂), e poi dopo 7, 15, 25, 40, 50 e 65 giorni di conservazione a 5°C (vedi Tabella 4; paragrafo 8.3).

Nella terza e quarta prova, condotte rispettivamente sul formaggio Taleggio DOP e Gorgonzola DOP, i campionamenti sono stati effettuati al tempo zero, e dopo 7, 14, 21 e 28 giorni (vedi Tabella 5; paragrafo 8.3). In questo caso, per ogni campionamento, si è proceduto di volta in volta a prelevare ¼ di forma, la cui superficie è stata lavata utilizzando 100 ml di soluzione APT al 6% in Tween® 80.

La prova eseguita con il Grana Padano DOP è stata caratterizzata da un solo punto di prelievo a 12 ore a causa della completa inattivazione del patogeno anche nel controllo già poche ore dall'inoculo stesso.

7.4 Prove sperimentali con disinfettanti

I disinfettanti utilizzati per le prove erano rispettivamente rappresentati da perossido di idrogeno (acqua ossigenata) ed acido lattico.

I campionamenti e le analisi microbiologiche sono stati condotti applicando la norma: “Numerazione di *Listeria monocytogenes* (LM), sui contaminati, su piastre di ALOA agar (ISO 11290-2) incubate in aerobiosi a 30°C per 48 ore”.

7.4.1. Sperimentazione con perossido di idrogeno (acqua ossigenata)

La prova è stata eseguita su piatti di Gorgonzola DOP e su forme di Taleggio DOP. E' stata eseguita la contaminazione della superficie dei formaggi con una miscela costituita da tre ceppi di *Listeria monocytogenes* (1 di riferimento ATCC e 2 ceppi di campo isolati da prodotti a base di latte).

In una prima prova sono state contaminate per immersione forme di Taleggio DOP (per una concentrazione batterica di partenza pari a $1,1 \times 10^6$ UFC/cm²) e piatti di Gorgonzola DOP (per una concentrazione batterica di partenza pari a $2,1 \times 10^6$ UFC/cm²) per circa 10 minuti. Dopo averle lasciate asciugare all'aria, le forme ed i piatti sono state nuovamente immerse in soluzioni contenenti il disinfettante al 10% (concentrazione di principio attivo-perossido di idrogeno: 4,2%) ed all'1% e, dopo averle lasciate a temperatura ambiente per circa 24 ore, si è proceduto al prelievo per verificare l'efficacia del trattamento.

Per le forme di Taleggio DOP, il conteggio di *Listeria monocytogenes* è stato effettuato sul liquido con cui sono state lavate le forme (100 ml di soluzione fisiologica) ed il risultato è stato rapportato alla superficie della forma. Per i piatti di Gorgonzola, il conteggio è stato invece eseguito su un pool di tre aree di 5 cm² prelevate con bisturi sterile.

In un secondo momento il disinfettante è stato nuovamente testato su piatti di Gorgonzola DOP. Anche in questo secondo test il piatto di Gorgonzola DOP è stato contaminato con una miscela dei tre ceppi di *Listeria monocytogenes*

precedentemente menzionati. La contaminazione è stata eseguita appoggiando per circa 10 minuti la faccia superiore del piatto di formaggio su un sottile film di soluzione del patogeno in modo da non inquinare la parte inferiore. Dopo che il prodotto è stato lasciato asciugare all'aria per circa 20 minuti a temperatura ambiente, è stato eseguito un campionamento in triplo con delimitatore (aree di 5 cm²), per verificare il livello di contaminazione.

È stato poi eseguito il campionamento in tre diversi punti del piatto di Gorgonzola al fine di verificare l'eventuale azione battericida del disinfettante.

La seconda prova è stata eseguita su croste di Gorgonzola, sulla superficie esterna di un salame e su una superficie ambientale pari a 100 cm² (vassoio in acciaio).

Le tre tipologie di campione sono state contaminate con una miscela costituita da tre ceppi di *Listeria monocytogenes* (1 di riferimento ATCC e 2 ceppi di campo), tale da ottenere una concentrazione sulle diverse superfici di circa 10⁶-10⁷UFC/cm². Con un'ansata della medesima sospensione batterica sono inoltre state seminate 2 piastre di ALOA.

Per quanto riguarda il Gorgonzola, la contaminazione è stata eseguita distribuendo omogeneamente tramite pipetta 15 ml di sospensione batterica a titolo noto, sulla faccia con crosta del formaggio.

La contaminazione della superficie esterna del salame è stata effettuata immergendo lo stesso in una soluzione a titolo noto di patogeno.

Per la superficie ambientale la contaminazione è stata eseguita in maniera analoga a quanto già descritto per la faccia del Gorgonzola.

Dopo la contaminazione, eseguita in doppio per ogni tipologia di superficie, le diverse matrici sono state lasciate asciugare adeguatamente per circa 60 minuti a temperatura ambiente.

Sono stati quindi eseguiti i seguenti campionamenti:

- prelievo in doppio sul formaggio, asportando 2 porzioni di superficie di 100 cm²;
- lavaggio della superficie del salame tramite 100 ml di APT e prelievo in singolo del liquido di lavaggio;

- campionamento in singolo del vassoio tramite utilizzo di tampone su una superficie di 100 cm².

I campioni e una delle 2 piastre di ALOA seminate sono quindi stati trasferiti in una cella di stagionatura impostata ad una temperatura di 10°C e UR (Umidità Relativa) pari all'85%. All'interno della cella è stata nebulizzata per 60 secondi una soluzione alla concentrazione al 10% del disinfettante (4,2% di principio attivo) e lasciata agire sulle diverse matrici per circa un'ora.

Al termine del trattamento sono state campionate le tre diverse superfici con la stessa modalità indicata precedentemente. La piastra di ALOA seminata con *Listeria monocytogenes* è stata incubata in termostato a 37°C per 48 ore, analogamente all'altra piastra che era stata conservata in frigorifero per la durata del trattamento.

7.4.2. Sperimentazione su croste di Gorgonzola con acidi organici naturali “cido lattico “

Novantasei (96) croste di Gorgonzola DOP (5 cm² ciascuna) del peso di circa 5 grammi sono state depositate su piastre Petri sterili. Di queste, 48 piastre sono state contaminate con una miscela di tre ceppi di *Listeria monocytogenes* ad una concentrazione di circa 10⁹ UFC/ml (ceppi: ATCC 19115, ceppo di campo IZSLER n° 103372/2 07, ceppo di campo IZSLER n° 299294/2 06, isolati rispettivamente da latte, formaggio e Gorgonzola). Le altre 48 piastre sono state contaminate con *Salmonella* Typhimurium ad una concentrazione di circa 10⁹ UFC/ml (ATCC6994, ceppo di campo IZSLER n° 96908, ceppo di campo IZSLER n° 43259/2). Dodici campioni contaminati con *Listeria monocytogenes* e 12 campioni contaminati con *Salmonella* Typhimurium sono stati utilizzati come controllo negativo (non trattato). Sono state preparate tre soluzioni di acido lattico rispettivamente al 1.5%, 3% e 5%.

Per ogni patogeno considerato, 12 piastre sono state addizionate con 1 ml di soluzione di acido lattico ad ognuna delle tre concentrazioni sperimentali, per un

totale di 36 piastre. I risultati sono espressi come media del triplice campionamento. Dopo essere state asciugate le piastre sono state richiuse e poste in frigorifero a 4°C.

7.4.3. Prove sperimentali di modulazione dell'andamento dei patogeni

Per differenti tipologie di prodotti sono state eseguite specifiche sperimentazioni finalizzate, anche mediante modelli di microbiologia predittiva, a valutare la possibile influenza delle flore lattiche sull'andamento dei patogeni. Protocolli sperimentali e risultati sono disponibili sul sito www.agricoltura.regione.lombardia.it nella relazione finale del Progetto.

8. Risultati e discussione

8.1 Identificazione degli stabilimenti, controllo microbiologico sui prodotti e sugli stabilimenti

Per tutti gli stabilimenti considerati si è proceduto, laddove ancora non disponibili, alla raccolta delle caratteristiche dei prodotti e dei processi e tutte le informazioni sono state rese disponibili sul sistema informativo www.ars-alimentaria.it.

Tutti i campioni di Grana Padano DOP esaminati (3.544 campioni) sono risultati negativi alla ricerca di *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp e *E. coli* VTEC. Anche i tamponi ambientali eseguiti in questi stabilimenti di produzione (4.000 tamponi) non hanno consentito di riscontrare la presenza di alcun patogeno.

Relativamente al Gorgonzola DOP sono stati campionati 27 stabilimenti per un totale di 380 raschiati di crosta e 608 tamponi ambientali. Solo in 3 stabilimenti non è stato possibile riscontrare la presenza di *Listeria* spp ed in 15 è stata isolata *Listeria monocytogenes*. Dei 380 raschiati di crosta il 57,1% è risultato positivo per *Listeria* spp e l'11% per *Listeria monocytogenes*.

Sono inoltre stati campionati 34 caseifici afferenti al Consorzio Taleggio DOP e 31 stagionatori per un totale di 900 campioni di crosta e 1.145 tamponi ambientali. L'83% degli stabilimenti è risultato positivo per *Listeria* spp e il 16,9% per *Listeria monocytogenes* su crosta; dei tamponi esaminati il 22,2% presentava contaminazione da *Listeria* spp e il 3,8% da *Listeria monocytogenes*.

Relativamente alla presenza di *Salmonella* spp in prodotti a base di carne e negli stabilimenti è emerso come, di 2.502 campioni esaminati 152 (6,1%) siano risultati positivi, mentre solo nel 2% dei tamponi ambientali è stato evidenziato il patogeno. Nella stessa tipologia di prodotti *Staphylococcus aureus* è stato riscontrato solo nello 0,45% dei campioni, mentre *Listeria monocytogenes* nel 18% dei casi esaminati.

Nei burri presi in esame, il 40% ha rivelato la presenza di *E. coli* anche se solo nell'1% si trattava di *E. coli* 0157.

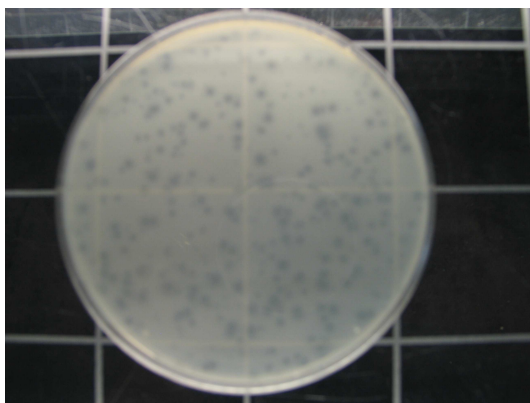
La presenza di *Clostridium botulinum* nel mascarpone non è stata evidenziata in nessun campione esaminato.

8.2 Messa a punto in laboratorio di metodiche di decontaminazione

Isolamento di fagi

E' stato possibile isolare fagi soprattutto nei confronti di *Listeria Monocytogenes* (Figura 1). Tra questi, per le prove sperimentali è stato utilizzato un fago denominato IZS1.

Figura 1 - Crescita di placche fagiche su terreno PCA (Plate Count Agar).

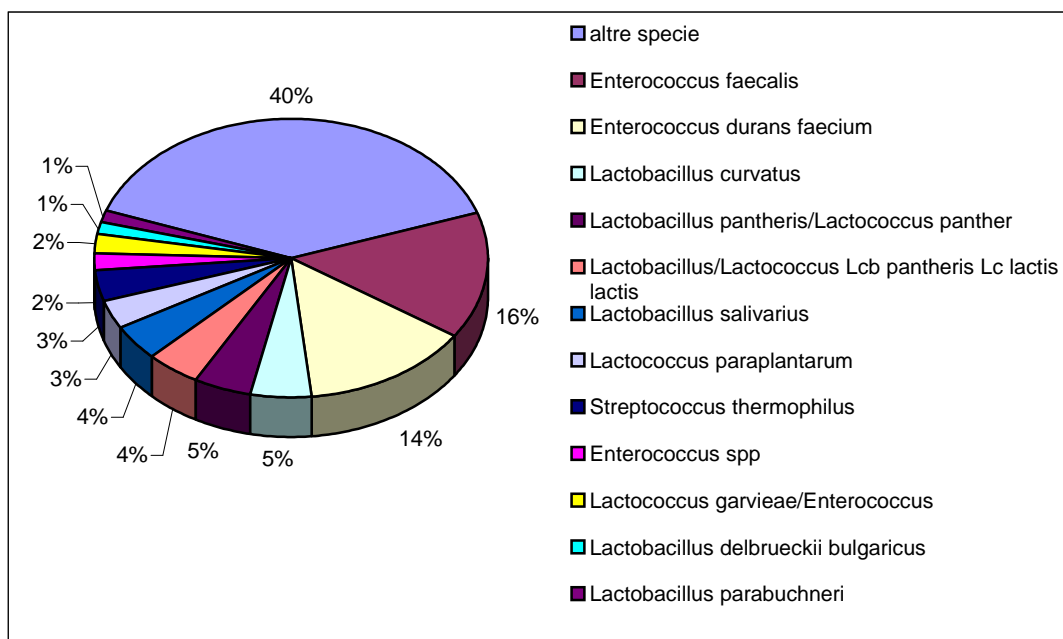


Isolamento dei batteri lattici dalla matrice e caratterizzazione molecolare mediante ARDRA e RiboPrinter

Dai diversi lotti di formaggi DOP sono stati isolati 1.156 ceppi. Ciascuno di questi era presente ad una concentrazione minima di 10^7 UFC/g di formaggio, corrispondente alla quantità minima prevista per i probiotici. Sulla base delle tecniche di caratterizzazione molecolare utilizzate, sono stati identificati 426 ceppi appartenenti al gruppo delle flore lattiche. Le due specie prevalenti rilevate mediante tecnica ARDRA sono risultate *Enterococcus faecalis* (16%) ed *Enterococcus durans faecium* (14%). Altre specie meno rappresentate sono state:

Lactobacillus curvatus (5%); *Lactobacillus pantheris/Lactococcus panther* (5%); *Lactobacillus/Lactococcus Lcb pantheris Lc lactis* (4%); *Lactococcus paraplantarum* (3%); *Streptococcus thermophilus* (3%); *Enterococcus spp* (2%); *Lactococcus garviae/Enterococcus* (2%); *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* (1%); *Lactobacillus parabuchneri* (1%). Il 40% del totale dei ceppi analizzati era costituito da specie microbiche in percentuale singolarmente poco rilevante e tra questi sono stati identificati anche *Lactobacillus lactis cremoris* e *Lactobacillus salivarius*. I risultati ottenuti mediante ribotipizzazione automatica hanno confermato la caratterizzazione molecolare eseguita con metodo ARDRA. Nella Figura 2, viene riportata la distribuzione dei ceppi isolati ed identificati mediante il metodo ARDRA.

Figura 2 - Identificazione delle flore lattiche isolate da formaggi DOP mediante il metodo ARDRA (elenco decrescente in legenda disposto in senso orario nel grafico)

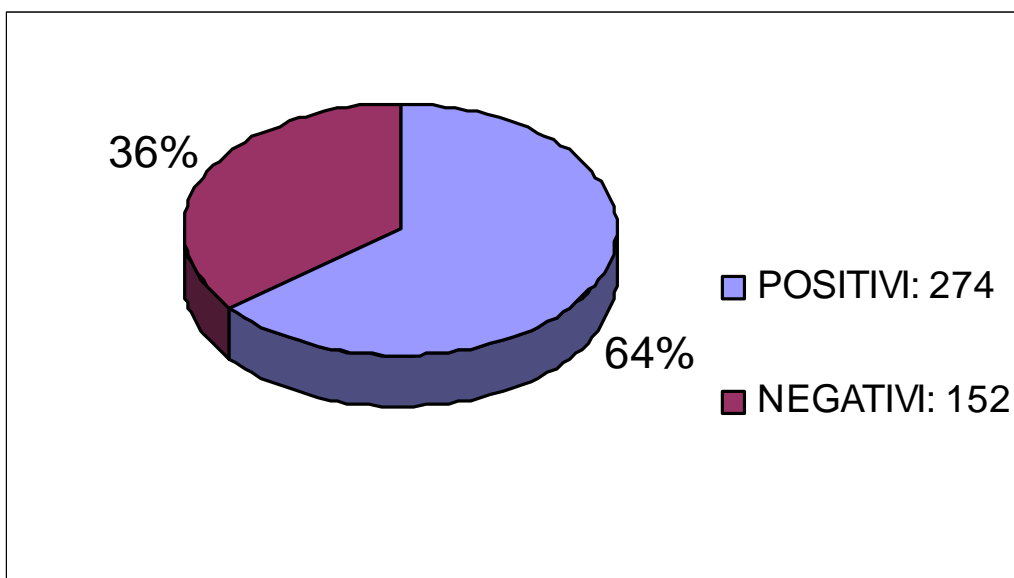


Produzione di batteriocine

Su un totale di 426 ceppi di batteri lattici (Figura 3), 274 (pari al 64%) hanno determinato la formazione dell'alone di inibizione nei confronti dei microrganismi patogeni riconducibile alla produzione di batteriocine. I ceppi che non hanno

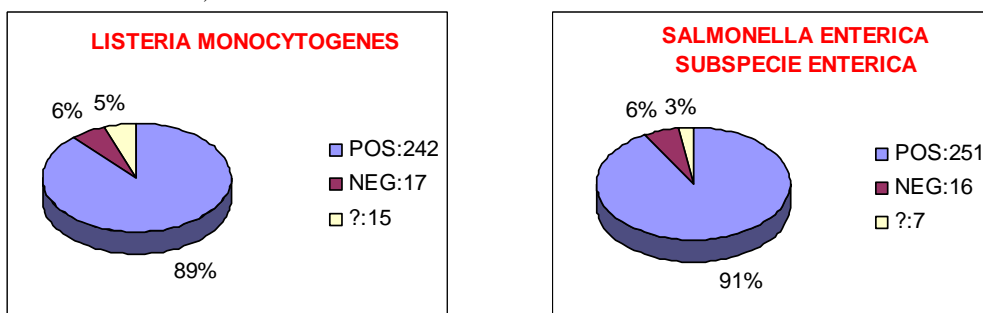
determinato aloni di inibizione della crescita dei patogeni sono stati qualificati come 'negativi'.

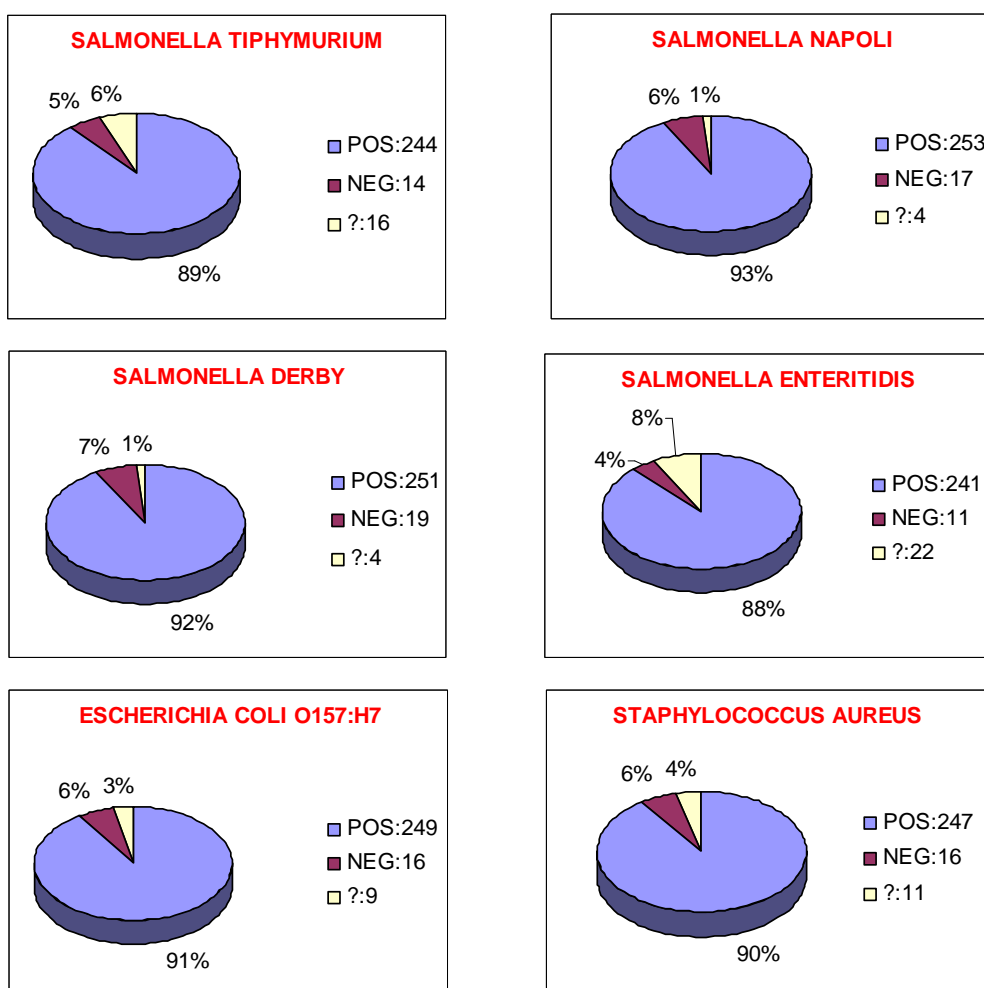
Figura 3 - Esito del saggio di produzione di batteriocine (indicati come positivi i batteri lattici risultati attivi nei confronti di almeno un ceppo patogeno)



Nella Figura 4 invece, sono riportate per ogni singolo patogeno le percentuali relative al numero di batteri lattici produttori di batteriocine in grado di inibirne la crescita.

Figura 4 - Esito verso singolo patogeno del saggio di produzione di batteriocine (? = risultato dubbio)

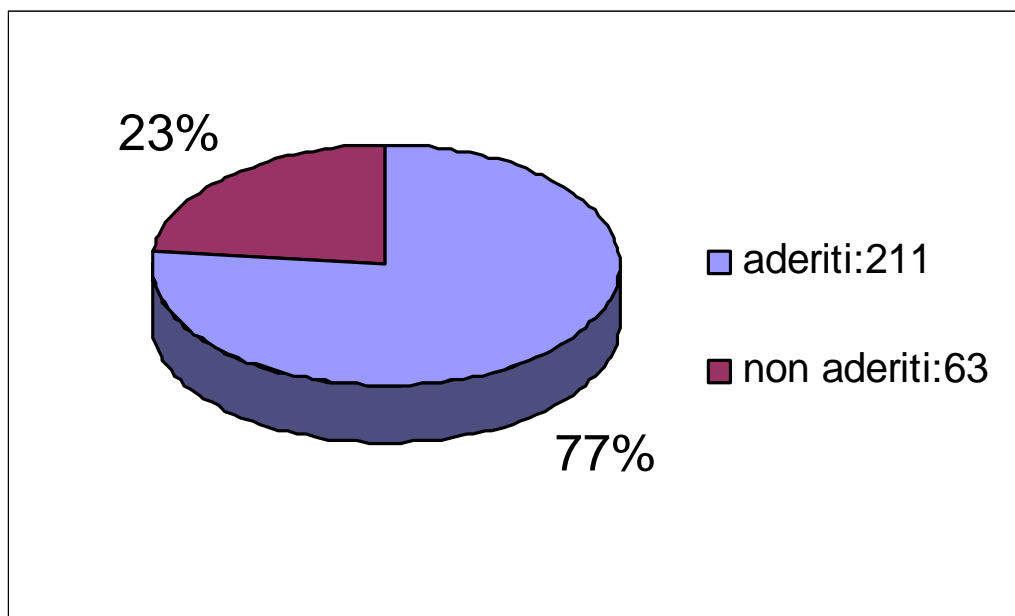




Adesività dei batteri lattici al substrato cellulare

I 274 batteri lattici produttori di batteriocine sono stati testati per valutare la loro capacità di aderire ad un substrato cellulare, in grado di riprodurre *in vitro* le caratteristiche morfo-funzionali degli enterociti (Caco-2). Il fattore discriminante che ha permesso di valutare l'aderenza del batterio lattico alla linea cellulare Caco-2, è stato la perdita di due logaritmi tra la conta delle colonie prima dell'inoculo e la conta delle colonie dopo l'inoculo sul substrato cellulare. Utilizzando questo criterio, 211 ceppi (pari al 77%) sono risultati dotati di capacità adesiva (Figura 5).

Figura 5 - Esito del saggio di adesione dei batteri lattici al substrato cellulare (Caco-2)



8.3 Prove sperimentali su prodotti artificialmente contaminati

Prove sperimentali con batteriofagi

Profilo di *Listeria monocytogenes* e del Batteriofago IZS1: osservando i risultati riportati nella Tabella 1 e nel relativo grafico (Figura 6) si nota come nel campione trattato, il titolo di *Listeria monocytogenes* subisca un abbattimento superiore ai sette logaritmi rispetto al corrispettivo campione di controllo. Questa differenza è già visibile al tempo zero.

Tabella 1 - Schema campionamenti e prelievi effettuati sul latte UHT parzialmente scremato. C +: 1 ml di *Listeria monocytogenes* (con titolo di 10^8 UFC/ml) in 9 ml di latte; C.T.: 1ml di *Listeria monocytogenes* (con titolo di 10^8 UFC/ml) in 9 ml di latte + 1 ml di Batteriofago IZS1 (con titolo di 10^{10} UFP/ml); T₀: prelievo al tempo zero; T_{12h}: prelievo dopo 12 ore; T_{24h}: prelievo dopo 24 ore. Temperatura d'incubazione: 4°C. Dati espressi in UFC/ml.

Diluizioni	- 1		- 2		- 3		- 4		- 5		- 6		- 7	
	C +	C. T.	C +	C. T.	C +	C. T.	C +	C. T.	C +	C. T.	C +	C. T.	C +	C. T.
T ₀	>10 ⁹	34	>10 ⁹	4	>10 ⁹	/	>10 ⁹	/	>10 ⁹	/	30	/	3	/
T _{12h}	>10 ⁹	/	>10 ⁹	/	>250	/	>250	/	195	/	18	/	2	/
T _{24h}	>10 ⁹	/	>10 ⁹	/	>250	/	>250	/	>250	/	53	/	3	/

Figura 6 - Andamento di *Listeria monocytogenes* e Batteriofago IZS1 in latte UHT parzialmente scremato con titolo iniziale di *Listeria monocytogenes* pari a 10^8 UFC/ml

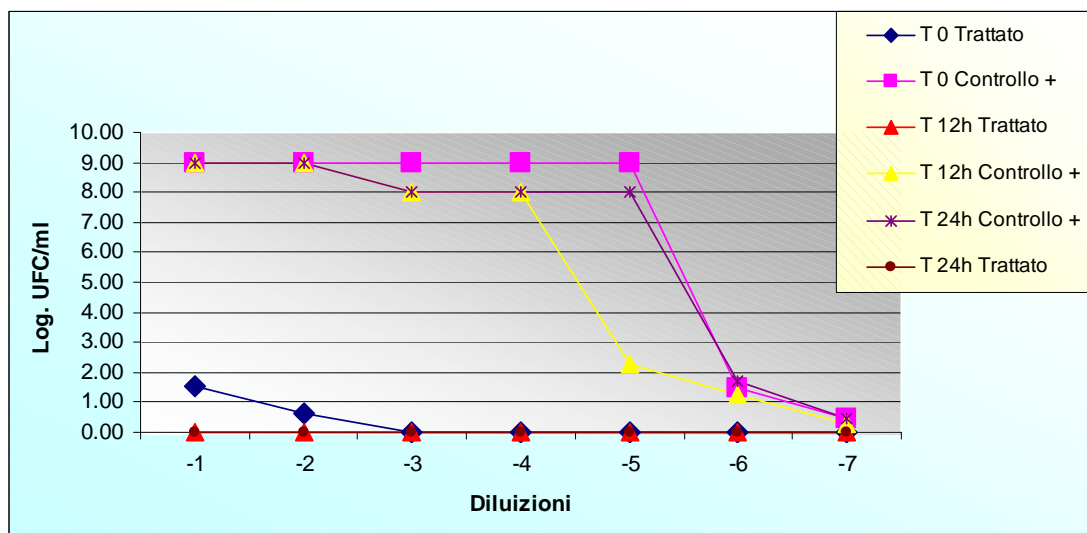
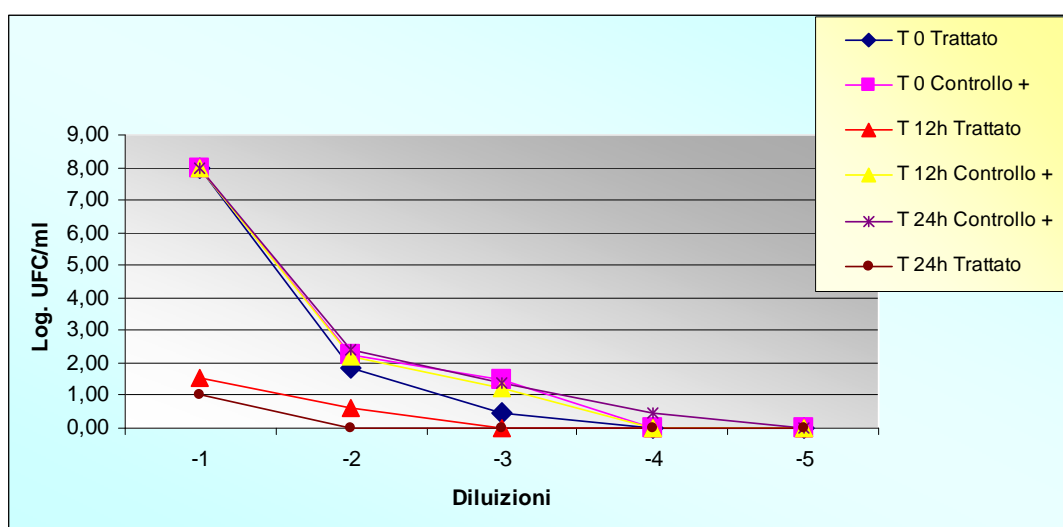


Tabella 2 - Schema campionamenti e prelievi effettuati sul latte UHT parzialmente scremato. C+: 1 ml di *Listeria monocytogenes* (con titolo di 10^5 UFC/ml) in 9 ml di latte; C.T.: 1 ml di *Listeria monocytogenes* (con titolo di 10^5 UFC/ml) in 9 ml di latte + 1 ml di Batteriofago IZS1 (con titolo di 10^5 UFP/ml); T₀: prelievo al tempo zero; T_{12h}: prelievo dopo 12 ore; T_{24h}: prelievo dopo 24 ore. Temperatura d'incubazione: 4°C. Dati espressi in UFC/ml.

Diluizioni	- 1		- 2		- 3		- 4		- 5	
	C +	C. T.	C +	C. T.	C +	C. T.	C +	C. T.	C +	C. T.
T ₀	>250	>250	172	71	30	3	1	/	/	/
T _{12h}	>250	126	166	31	17	/	/	/	/	/
T _{24h}	>250	10	245	1	25	/	3	/	/	/

Figura 7 - Andamento di *Listeria monocytogenes* e Batteriofago IZS1 in latte UHT parzialmente scremato con titolo iniziale di *Listeria monocytogenes* pari a 10^5 UFC/ml

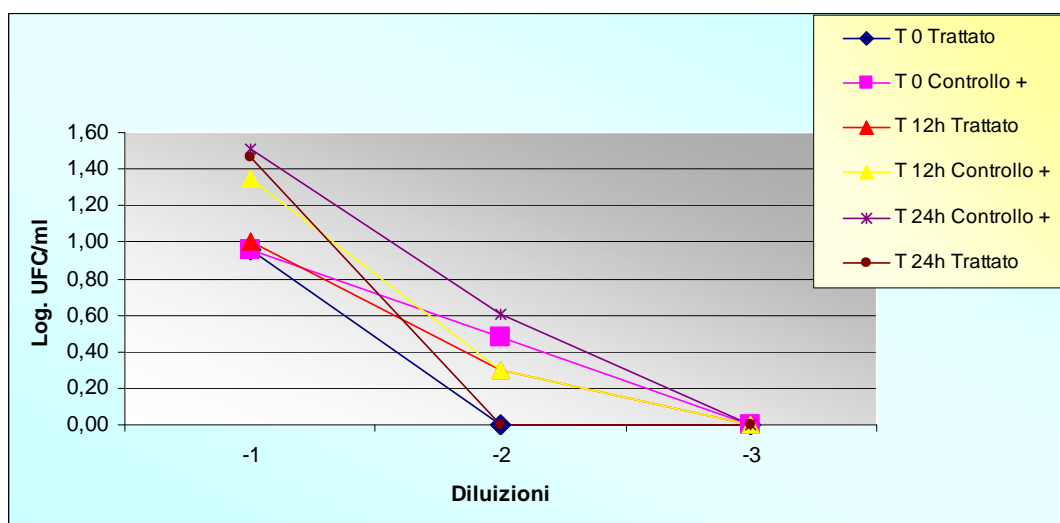


Nel secondo caso, dove le concentrazioni del patogeno e del fago sono state diminuite di 3 logaritmi e cinque rispettivamente (vedi Tabella 2), si nota come nel campione trattato il titolo di *Listeria monocytogenes* subisca sempre un abbattimento, anche se in maniera inferiore (Figura 7). Nel terzo caso, invece, dove le concentrazioni sono state ulteriormente diminuite di altre 2 grandezze logaritmiche, l'abbattimento del patogeno è quasi irrilevante e fortemente dipendente dalla poca presenza del virus (Tabella 3 e Figura 8).

Tabella 3 - Schema campionamenti e prelievi effettuati sul latte UHT parzialmente scremato. C+: 1 ml di *Listeria monocytogenes* (con titolo di 10^3 UFC/ml) in 9 ml di latte; C.T.: 1 ml di *Listeria monocytogenes* (con titolo di 10^3 UFC/ml) in 9 ml di latte + 1 ml di Batteriofago IZS1 (con titolo di 10^3 UFC/ml); T₀: prelievo al tempo zero; T_{12h}: prelievo dopo 12 ore; T_{24h}: prelievo dopo 24 ore. Temperatura d'incubazione: 4°C. Dati espressi in UFC/ml

Diluizioni	- 1		- 2		- 3	
	C +	C. T.	C +	C. T.	C +	C. T.
T ₀	9	9	3	/	/	/
T _{12h}	22	10	2	2	/	/
T _{24h}	32	29	4	1	/	/

Figura 8 - Andamento di *Listeria monocytogenes* e Batteriofago IZS1 in latte UHT parzialmente scremato con titolo iniziale di *Listeria monocytogenes* pari a 10^3 UFC/ml



In Tabella 4 si osserva come, nei campioni che fungevano da controlli positivi, il titolo di *Listeria monocytogenes* si sia mantenuto costante e simile a quello di partenza ($\approx 10^2$ UFC/ml) per i primi 10 giorni d'incubazione. Dopo tale periodo si nota come il patogeno abbia avuto una tendenza a riprodursi e ad aumentare la propria concentrazione (Figura 9), che è rimasta più o meno costante per i successivi 50 giorni. Nelle corrispettive porzioni trattate con il batteriofago si

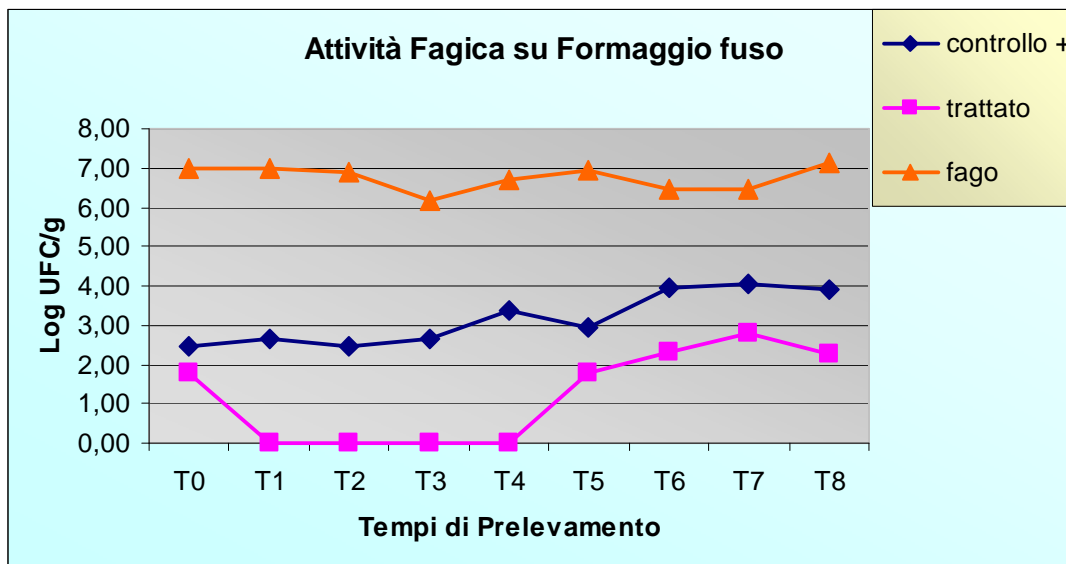
nota, invece, come il titolo di *Listeria monocytogenes* si sia mantenuto al di sotto del limite di rilevabilità possibile tramite piastratura del campione, per più di due settimane (Figura 9). Solo dopo 20 giorni dall'inizio della sperimentazione, infatti, si nota un aumento del titolo del patogeno in esame all'interno delle porzioni di formaggio fuso trattate col Batteriofago IZS1. Tale aumento, che ha raggiunto un valore finale di circa 10^2 UFC/ml, è risultato comunque inferiore al titolo rilevato nelle rispettive porzioni di controllo. Nel successivo periodo d'incubazione, l'andamento del patogeno nei campioni trattati con IZS1 si è mantenuto più o meno costante fino a fine sperimentazione, non superando il livello di concentrazione di *Listeria monocytogenes* riscontrato nel controllo (Figura 9). Per quanto riguarda l'andamento del Batteriofago IZS1, si evidenzia come quest'ultimo si sia mantenuto pressoché costante per tutta la durata della sperimentazione, confermando una concentrazione di circa $10^6 - 10^7$ UFP/ml.

Tabella 4 - Schema campionamenti e prelievi effettuati su porzioni di formaggio fuso

<u>Attività a 5°C</u>	Controllo Positivo C+ LISTERIA UFC/g	Campione Trattato LISTERIA UFC/g	Campione Trattato FAGO UFP/g	Date Prelievi
T₀	3×10^2	6×10^1	9×10^6	Tempo zero
T₁	4.5×10^2	0	9.3×10^6	12 ore
T₂	3×10^2	0	7.8×10^6	24 ore
T₃	4.5×10^2	0	1.5×10^6	7 giorni
T₄	2.2×10^3	0	5.1×10^6	15 giorni
T₅	9×10^2	6×10^1	8.8×10^6	25 giorni
T₆	9.4×10^3	2.1×10^2	3×10^6	40 giorni
T₇	1.1×10^4	6×10^2	3×10^6	50 giorni

T_8	8.3×10^3	1.8×10^2	1.38×10^7	65 giorni
-------	-------------------	-------------------	--------------------	-----------

Figura 9 - Andamento di *Listeria monocytogenes* e Batteriofago IZS1 in porzioni di formaggio fuso a 5°C. T1: 12 ore; T2: 24 ore; T3: 7 giorni; T4: 15 giorni; T5: 25 giorni; T6: 40 giorni; T7: 50 giorni; T8: 65 giorni

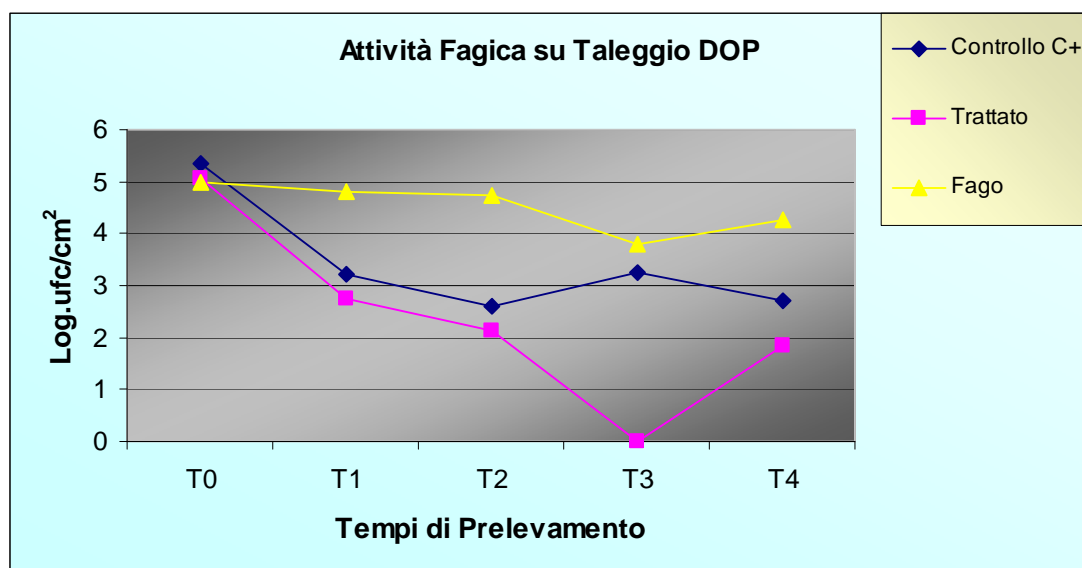


In Figura 10 sono riportati rispettivamente gli andamenti di *Listeria monocytogenes* e del Batteriofago IZS1, sulle forme di Taleggio DOP utilizzate per la sperimentazione e conservate per tutta la sua durata ad una temperatura di 5°C (temperatura simile alle condizioni in cui l'alimento dovrebbe essere mantenuto nel circuito della grande distribuzione). In questo caso, si evidenzia come l'andamento del batteriofago nel corso della sperimentazione (28 giorni) tende a diminuire, anche se solo di un'unità logaritmica, passando da una concentrazione iniziale di circa 10^5 UFP/cm² ad una concentrazione di circa 10^4 UFP/cm² (Tabella 5). La concentrazione del patogeno, sia nel campione trattato che in quello non trattato, tende a calare considerevolmente già dopo una settimana, diminuendo di 2,5 – 2 unità logaritmiche rispettivamente, per poi mantenersi più o meno costante nelle successive 3 settimane. Si nota come *Listeria monocytogenes* nel campione trattato presenti sempre una concentrazione più bassa rispetto al corrispettivo campione di controllo (Figura 10).

Tabella 5 - Schema campionamenti e prelievi effettuati su Taleggio DOP

<u>Attività a 5°C</u>	Controllo Positivo C+ LISTERIA UFC/cm²	Campione Trattato LISTERIA UFC/cm²	Campione Trattato FAGO UFP/cm²
T ₀	2,3x10 ⁵	1,2x10 ⁵	9,6x10 ⁴
T₁ (7 giorni)	1,6x10 ³	5,8x10 ²	6,5x10 ⁴
T₂ (14 giorni)	3,9x10 ²	1,4x10 ²	5,4x10 ⁴
T₃ (21 giorni)	1,8x10 ³	N.D.	6x10 ³
T₄ (28 giorni)	5,2x10 ²	6.8x10 ¹	1.9x10 ⁴

Figura 10 - Andamento di *Listeria monocytogenes* e Batteriofago IZS1 su forme di Taleggio DOP, incubate a 5°C. T1: 7 giorni; T2: 14 giorni; T3: 21 giorni; T4: 28 giorni



Prove con Gorgonzola DOP: le prove, condotte rispettivamente a 5 e 10°C hanno dato risultati sovrapponibili a quelli ottenuti sulle superfici del Taleggio. In nessun caso tuttavia la sperimentazione ha potuto protrarsi per un periodo superiore ai 30 giorni poiché, probabilmente a causa di fattori ambientali limitativi come temperatura e umidità, presenti nelle condizioni sperimentali e sulle sole croste,

dopo tale data si osservava costantemente la drastica diminuzione della presenza di *Listeria monocytogenes* anche nei campioni di controllo.

La prova eseguita sul Grana Padano DOP non ha consentito di fornire utili informazioni poiché il patogeno in esame non era più riscontrabile dopo poche ore dall'infezione. Il fago impiegato ha comunque dimostrato di sopravvivere per tutto il periodo di stagionatura delle forme, indicando quindi una possibilità applicativa.

8.4 Prove sperimentali con disinfettanti

Nella prima prova, Tabella 6 e 7, il Taleggio DOP presentava una contaminazione di *Listeria monocytogenes* di partenza pari a circa $1,1 \times 10^6$ UFC/cm². Nella forma di Taleggio DOP lasciata asciugare e poi trattata con soluzione di disinfettante al 10%, dopo 24 ore a temperatura ambiente, si è osservata la diminuzione della concentrazione di *Listeria monocytogenes* di circa 2 logaritmi ($2,4 \times 10^4$ UFC/cm²).

Nella forma di Taleggio DOP lasciata asciugare e poi trattata con soluzione di disinfettante al 1%, dopo 24 ore a temperatura ambiente, si è osservato la diminuzione della concentrazione di *Listeria monocytogenes* di circa 2 logaritmi ($1,9 \times 10^4$ UFC/cm²), sostanzialmente uguale all'abbattimento ottenuto nella forma trattata con concentrazione di disinfettante al 10%.

Sempre nella prima prova i piatti di Gorgonzola DOP presentavano una contaminazione iniziale di *Listeria monocytogenes* di circa $2,1 \times 10^6$ UFC/cm².

Nel piatto di Gorgonzola lasciato asciugare e poi trattato per immersione con soluzione di disinfettante al 10%, dopo 24 ore a temperatura ambiente, si è osservata la diminuzione della concentrazione di *Listeria monocytogenes* inferiore a un logaritmo (7×10^5 UFC/cm²).

Nel piatto di Gorgonzola lasciato asciugare e poi trattato per immersione con soluzione di disinfettante al 1%, dopo 24 ore a temperatura ambiente, non è stata

evidenziata differenza significativa rispetto alla concentrazione di contaminazione.

Tabella 6 - Concentrazione di Listeria monocytogenes riscontrata sulle diverse superfici (espressa come UFC/cm²) dopo trattamento di 24 h con disinfettante al 10%

SUPERFICIE	PRE-TRATTAMENTO	POST-TRATTAMENTO
Crosta Taleggio DOP	1,1 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁴
Piatto Gorgonzola DOP	2,1 x 10 ⁶	7,5 x 10 ⁵

Tabella 7 - Concentrazione di Listeria monocytogenes riscontrata sulle diverse superfici (espressa come UFC/cm²) dopo trattamento di 24 h con disinfettante al 1%

SUPERFICIE	PRE-TRATTAMENTO	POST-TRATTAMENTO
Crosta Taleggio DOP	1,1 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁴
Piatto Gorgonzola DOP	2,1 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁶

Nella seconda prova, eseguita su croste di Gorgonzola DOP, sulla superficie esterna di un salame e su un vassoio in acciaio di 100 cm², Tabella 8, il campionamento sul piatto di Gorgonzola è stato eseguito in triplo su aree di 5 cm², per verificare il livello di contaminazione artificiale iniziale ed ha fornito il seguente risultato:

- 4,6 x 10⁸ UFC/cm²
- 3,2 x 10⁸ UFC/cm²
- 6,8 x 10⁸ UFC/cm²

con un valore medio di 6,8 x 10⁸ UFC/cm².

Il campionamento, eseguito dopo un contatto di 60 minuti col disinfettante al 10%, ha fornito il seguente esito:

- 2,2 x 10⁸ UFC/cm²

- $2,5 \times 10^8$ UFC/cm²
- $7,3 \times 10^8$ UFC/cm²

con un valore medio di 4×10^8 UFC/cm².

Il disinfettante quindi, alla concentrazione consigliata di utilizzo (10%) non ha presentato efficacia nei confronti di *Listeria monocytogenes*.

Tabella 8 - Concentrazione di *Listeria monocytogenes* riscontrata sulle diverse superfici (espressa come UFC/cm²) dopo trattamento di 1 h con disinfettante al 10%

SUPERFICIE	PRE-TRATTAMENTO	POST-TRATTAMENTO
Crosta Gorgonzola	$6,8 \times 10^8$	4×10^8
Salame	2×10^5	$2,6 \times 10^4$
Vassoio	5×10^1	5×10^1

Per quanto riguarda la superficie esterna del salame, il trattamento ha determinato la diminuzione del titolo batterico di un valore logaritmico, mentre sul vassoio in acciaio non si è stata rilevata una sostanziale variazione nella concentrazione del patogeno.

La piastra di ALOA seminata con un'ansata della miscela di *Listeria monocytogenes* e posizionata in cella di stagionatura (10°C, 85% UR) durante il trattamento con disinfettante, ha consentito la crescita del patogeno in modo del tutto analogo a quello della piastra di controllo non sottoposta a trattamento.

Sperimentazione su croste di Gorgonzola con acidi organici naturali - "acido lattico"

Pur necessitando di ulteriori dati sperimentali si può definire che l'acido lattico, anche in basse concentrazioni, abbia un blando effetto sulla concentrazione di patogeni nella crosta del formaggio Gorgonzola (dati non riportati).

Prove di modulazione dei patogeni

I risultati delle sperimentazioni sono riportati nella relazione finale del Progetto all'interno del sito www.agricoltura.regione.lombardia.it.

9. Conclusioni

I risultati, nel loro complesso, mettono in evidenza da un lato la necessità di approfondire gli sforzi al fine di potere assicurare maggiori garanzie di sicurezza alimentare e, dall'altro, come alcune prassi di biodecontaminazione, seppure da sole non esaustive, possano contribuire a tale obiettivo.

E' evidente, infatti, come le aziende alimentari non siano in grado di garantire la totale sicurezza degli alimenti e di evitare i casi di tossinfezioni alimentari, nonostante le buone prassi igieniche, l'introduzione dell'analisi del rischio e dei punti critici di controllo (HACCP) (29).

Le prove eseguite con i fagi hanno evidenziato come questi ultimi possano svolgere un'azione di contrasto nei confronti di *Listeria monocytogenes* all'interno di una matrice alimentare liquida, quale il latte parzialmente scremato a lunga conservazione mantenuto a una temperatura di conservazione di 4°C. Tali prove hanno permesso di individuare il titolo minimo necessario di batteriofago in grado di garantire un'efficace attività nei confronti del patogeno. Più precisamente, si è dimostrato come il Batteriofago IZS1 sia in grado di svolgere la propria attività battericida già dopo poco tempo dalla sua aggiunta all'interno dell'alimento e di protrarla nel tempo anche dopo 48 ore. Infatti, già al tempo zero, il fago è in grado di abbattere il patogeno, indipendentemente dal titolo di partenza di quest'ultimo. Inoltre, queste condizioni si mantengono costanti anche con un titolo iniziale del batteriofago inferiore a 10^8 UFP/ml. Tuttavia, si può notare come la migliore attività del Batteriofago IZS1 nei confronti della *Listeria monocytogenes* sia svolta usando concentrazioni superiori a 10^7 UFP/ml. Tale attività è direttamente connessa con la temperatura di conservazione ed il rapporto tra la concentrazione fagica e quella batterica. I limiti di questa prova sono consistiti nel fatto che non forniscono informazioni sulla durata a lungo termine dell'attività fagica e sull'interazione con una matrice più complessa, come quella solida, nella quale esistono barriere fisiche all'incontro tra fago e cellula batterica (ciò che determina in valore assoluto le apparenti cadute di efficacia di questo

trattamento). Il passo successivo, infatti, è stato quello di valutare l'attività del Batteriofago IZS1 su porzioni di formaggio fuso per avere ulteriori conferme della sua azione all'interno di matrici alimentari più complesse, oltre che ad ottenere informazioni sulla sua attività nel tempo alla medesima temperatura. I risultati ottenuti nella seconda prova hanno evidenziato come il titolo del batteriofago si sia mantenuto costante per tutto il periodo della sperimentazione. Inoltre, si può notare come la temperatura di conservazione non abbia alterato l'attività del fago nei confronti del patogeno. Per quanto riguarda quest'ultimo, i dati ottenuti hanno dimostrato che *Listeria monocytogenes* è stata mantenuta sotto controllo dall'effetto battericida del Batteriofago IZS1. Infine, nella terza parte della sperimentazione è stato utilizzato come substrato la forma del Taleggio DOP, per rendere i risultati sperimentali il più possibile rappresentativi della situazione reale di commercializzazione e conservazione. Infatti, la matrice risulta molto più complessa rispetto alle porzioni di formaggio fuso, in quanto presenta una superficie irregolare e ruvida in crosta, presenta flore batteriche naturalmente presenti nell'alimento e valori di pH sicuramente più bassi. Nonostante l'introduzione delle suddette variabili, il Batteriofago IZS1 ha confermato, anche se con minori effetti, i risultati ottenuti in precedenza. Un'ulteriore conferma è stata data dall'efficacia temporale del trattamento alla temperatura di conservazione considerata (5° C). I risultati evidenziano come la concentrazione, e soprattutto l'attività, del Batteriofago IZS1 si siano mantenute costanti per tutto il periodo preso in esame nelle sperimentazioni. Inoltre è stato evidenziato come la temperatura di conservazione non abbia alterato l'attività del batteriofago nei confronti di *Listeria monocytogenes*; tuttavia, i suoi effetti inibitori sono risultati dose dipendenti.

In definitiva, il Batteriofago IZS1 non solo non ha proprietà indesiderabili, ma rappresenta un vero e proprio agente naturale “anti- *Listeria monocytogenes*”. Tali risultati forniscono un piccolo passo verso l'esigenza di ottenere l'omologazione dell'utilizzo dei fagi come decontaminanti nei cibi e nei processi di trasformazione, dove *Listeria monocytogenes* rappresenta una presenza talora

difficilmente ovviabile dell'ambiente. Di fatto, appare logica una futura applicazione nel biocontrollo dei patogeni come valido contributo alla salute pubblica.

Per quanto riguarda le sperimentazioni condotte sul possibile utilizzo di batteri lattici dotati di capacità biocompetitiva mediante elaborazione di batteriocine, alla luce dei risultati ottenuti, il 50% dei 426 ceppi di batteri lattici analizzati ha dimostrato *in vitro* di possedere potenziali proprietà capaci di apportare all'organismo umano un incremento della salute e del benessere. La produzione delle batteriocine e la capacità di adesione alle cellule intestinali risultano essere caratteristiche che conferiscono alla popolazione di batteri lattici presenti nei formaggi DOP la peculiarità di probiotici. I risultati ottenuti forniscono quindi una documentazione scientifica per il consumatore per quanto riguarda la presenza di flore lattiche attive e funzionali in un formaggio tradizionale lombardo quale ad esempio il Silter DOP. Queste caratteristiche, unite alle proprietà nutrizionali ed al legame con il territorio che contraddistinguono i prodotti tradizionali, possono essere considerate elementi di valorizzazione del prodotto stesso, ad incremento del valore aggiunto. Le prove sperimentali di contaminazione hanno ulteriormente supportato la considerazione che le popolazioni lattiche, endogene o no, oltre a svolgere un'azione benefica per caratteristiche intrinseche, possono modulare l'andamento dei patogeni contrastandone di fatto una libera crescita. L'efficacia delle popolazioni lattiche biocompetitive rappresenta quindi una possibilità da cogliere, e in parte già colta, da parte di produttori di alimenti quali il Taleggio, il salame e i prodotti fermentati in genere, nei quali la presenza dei patogeni (*Salmonelle* spp. e *Listeria* spp.) può essere validamente contrastata già durante la maturazione, ma ancor più durante la shelf life, anche su prodotto affettato o porzionato.

Il trattamento superficiale delle forme di Taleggio DOP con soluzioni del disinfettante e successiva sosta a temperatura ambiente per circa 24 ore è risultato blandamente efficace nei confronti di *Listeria monocytogenes*. L'utilizzo del disinfettante sia al 10% (concentrazione consigliata) che all'1% ha determinato

una riduzione di circa 2 logaritmi del patogeno presente sulla superficie del formaggio, mettendo in evidenza un dato per nulla trascurabile nelle condizioni normali di transfert del patogeno dall'ambiente. Tuttavia, va precisato che nell'esecuzione del test non è stato eseguito un campione di controllo per verificare l'eventuale abbattimento determinato dal lavaggio con una soluzione priva del disinfettante. Minore effetto è stato osservato su piatti di Gorgonzola DOP sottoposti a medesimo trattamento. La soluzione di disinfettante al 10% ha determinato, infatti, una riduzione inferiore ad un logaritmo, mentre non è stato evidenziato alcun effetto con la soluzione al 1%. Anche l'applicazione di una soluzione del disinfettante al 10% mediante nebulizzazione sul piatto di Gorgonzola non ha fornito risultati soddisfacenti.

Il progetto è stato pertanto caratterizzato dal raggiungimento di tutti gli obiettivi previsti, avendo sostanzialmente consentito di mettere in evidenza le possibilità applicative di metodi di biodecontaminazione nell'industria alimentare non solo a livello sperimentale ma anche nelle condizioni pratiche di stabilimento, come documentato dall'esito delle prove sperimentali dettagliate nella relazione finale del Progetto all'interno del sito www.agricoltura.regione.lombardia.it. Come già premesso, solo le sperimentazioni con batteriofagi, seppure incoraggianti dal punto di vista dei risultati sperimentali, non sono state condotte a livello di stabilimento per le ovvie ragioni legislative ancora lacunose a livello europeo. L'utilizzo dei fagi viceversa può al momento avvenire unicamente su superfici a contatto e ambienti, non direttamente sul prodotto senza che vengano elaborate le documentazioni di innocuità previste dalla normativa. Il progetto offre comunque un utile contributo alla conoscenza dell'efficacia dei fagi e può quindi contribuire a dare sostenibilità scientifica a supporto del loro utilizzo, fatte salve le verifiche di innocuità dei ceppi impiegati, come del resto suggerito ed auspicato dagli stessi documenti EFSA citati in introduzione.

10. Bibliografia

- (1) ISS: Istituto Superiore di Sanità; www.epicentro.iss.it.
- (2) Relazione annuale dell'EFSA "The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009".
- (3) Hagens S. and Loessner M.J. "Application of Bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens" *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 76: 513-519 (2007).
- (4) Federal registration 18 Agosto 2006 – volume 71 , numero 160.
- (5) Peek R. and Reddy K.R. "Gastroenterology and hepatology news" *Psetion Editor. Gastroenterology*, 131: 1370-1372 (2006).
- (6) Carlton R.M., Noordman W.H., Biswas B., de Meester E.D., Loessner M.J. "Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study and application". *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 43: 301-312 (2005).
- (7) García P., Martínez B., Obeso J.M. and Rodríguez A. "Bacteriophages and their application in food safety". *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 47: 479-485 (2008)).
- (8) The EFSA Journal (2009) 1076,1-26.
- (9) European Food Safety Authority's BIOHAZ panel 20th May 2009.
- (10) Mellefont LA, McMeekin TA, Rosst. 2008. "Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *International Journal of Food Microbiology*". 121(2): 157-68.
- (11) Amézquita A, Brashears MM. 2002. "Competitive inhibition of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products by lactic acid bacteria". *Journal of Food Protection*. 65(2):316-25.
- (12) Duffet F., Corre C., Leroi F., Dousset X., Boyaval P. "Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins

- of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon". *J Food Prot.* 1999 Dec; 62(12):1394-403.
- (13) Buchanan RL, Klawitter LA. "Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures". *Int J Food Microbiol.* 1991 Feb;12(2-3): 235-45.
- (14) Girardin H, Albagnac C, Dargaignaratz C, Nguyen-The C, Carlin F. "Antimicrobial activity of foodborne *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. against *Clostridium botulinum*". *J Food Prot.* 2002 May;65(5):806-13.
- (15) Tromp S.O., Rijgesberg H., Franz E. "Quantitative microbial risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Listeria monocytogenes* in leafy green vegetables consumed at salad bars, based on modeling supply chain logistics". *J Food Prot.* 2010;73(10):1830-40.
- (16) Hershey AD, Bronfenbrenner J. "Stepwise Liberation of Poorly Sorbed Bacteriophages". *J Bacteriol.* 1943 Mar;45(3):211-8.
- (17) Chibani-Chennoufi S, Sidoti J, Bruttin A, Dillmann ML, Kutter E, Qadri F, Sarker SA, Brüssow H. "Isolation of *Escherichia coli* bacteriophages from the stool of pediatric diarrhea patients in Bangladesh". *J Bacteriol.* 2004 Dec;186(24): 8287-94.
- (18) Barakat RK., Griffiths MW., Harris LJ. "Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* Spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat." *J. Food Microbiology* 62(1-2), 83-94 (2000).
- (19) Rodas AM., Ferrer S., Pardo I. "16s-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolate from grape must and wine". *Syst Appl Microbiol* 26(3) 412-22 (2003).
- (20) Giraffa G, De Vecchi P, Rossetti L. "Note: identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis". *Journal of Applied Microbiology.* 1998 Nov; 85(5): 918-24.

- (21) De Baere T., De Mendonca R., Claeys G., Verschraegen G., Mijs W., Verhelst R., Rottiers S., Van Simaey L., De Ganck C., Vaneechoutte M. "Evaluation of amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) for the identification of cultured mycobacteria in a diagnostic laboratory" *BioMedCentral Microbiology* 2:4 (2002).
- (22) Mohania D., Nagpal R., Kumar M., Bhardwaj A., Yadav M., Jain S., Marotta F., Singh V., Parkash O., Yadav H. "Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria". *Journal of digestive Diseases* 9 190-198 (2008).
- (23) Ryu C.S., Czajka J.W., Sakamoto M., Benno Y. "Characterization of the *Lactobacillus casei* group and the *Lactobacillus acidophilus* group by automated ribotyping". *Microbiol Immunol* 45(4) 271-275 (2001).
- (24) Collado M.C., Hernández M. "Identification and differentiation of *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* species in fermented milk products with bifidobacteria". *Microbiological Research* 162, 86-92 (2007).
- (25) JM lorenzo, MC García Fontà, A Cachaldora, I Franco, J. Carballo (2010) "Study of the lactic acid bacteria throughout the manufacture of dry-cured lacòn (a Spanish traditional meat product). Effect of some additives". *Food Microbiology* 27 229-235.
- (26) H. Blom, T.Katla, F.B.Hagen, L.Axelsson (1997) "A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins" *International Journal of Food Microbiology*. 38 103-109.
- (27) D.G. Hoover; L. R. Steenson; (1993) "Screening methods for detecting bacteriocin activity". In: "Bacteriocin of lactic acid bacteria" Chap 2.
- (28) H. Kimoto, J:Kurisaki, N.M. Tsuji, S.Ohmomo, T.Okamoto (1999) "Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile". *Letters in Applied Microbiology* 29 313-316.

- (29) M. De Giusti, C. Aurigemma, L. Marinelli, D. Tufi, D. De Medici, S. Di Pasquale, C. De Vito, and A. Boccia. "The evaluation of the microbial safety of fresh ready-to-eat vegetables produced by different technologies in Italy". *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.



Regione Lombardia
Agricoltura

Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura
www.agricoltura.regione.lombardia.it