

RICERCA DI LISTERIA MONOCYTOGENES IN LATTE CRUDO DI BUFALA IN PRODUZIONE PRIMARIA

EVALUATION OF LISTERIA MONOCYTOGENES IN RAW BUFFALO MILK DURING PRIMARY PRODUCTION

Murru N., Barile M., Tozzi M., Ceres C., Aprea G., Cortesi M.L.

Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli alimenti di o.a. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

SUMMARY

Regulation EC 852/2004 lays down rules concerning hygiene requirements and the adoption of adequate measures for identification, prevention and control of contamination risks during milking in primary production. Aim of this research was to detect *Listeria monocytogenes* and to check the total viable count (TVC) at 30° in raw buffalo milk coming from ten dairy farms. On the whole 207 samples of raw buffalo milk were collected and analysed during one year, 189 samples were collected from single animals and 18 samples from tank-bulk milk. In raw bulk-tank milk *Listeria monocytogenes* was never detected. In two out five positive samples from single animals *Listeria monocytogenes* was detected by means of quantitative method at levels ≤ 1 cfu/ml.

Key words

Primary production, raw buffalo milk, *Listeria monocytogenes*.

INTRODUZIONE

Il concetto di filiera ha trovato ampia affermazione nel corpus normativo comunitario che, con i regolamenti del "pacchetto igiene", ha sancito, anche a livello della produzione primaria, precise responsabilità degli operatori del settore alimentare, che devono assicurare il rispetto di standard igienici, requisiti specifici e criteri microbiologici.

Anche nella filiera lattiero-casearia il Regolamento (CE) 852/2004 prevede, in produzione primaria, il rispetto di requisiti in materia d'igiene e l'adozione di misure adeguate per l'individuazione, la prevenzione ed il controllo delle contaminazioni connesse alla mungitura, allo stoccaggio, alla raccolta del latte, nonché, così come stabilito dal Regolamento 853/2004, l'osservanza di criteri microbiologici relativi, in questa fase, alla sola valutazione, della carica batterica a 30°C nel latte (4,5).

Il monitoraggio della contaminazione del latte è di fondamentale importanza nella produzione pri-

maria, dal punto di vista sia igienico che sanitario, specialmente quando esso è destinato crudo alla trasformazione. In seguito a contaminazioni, determinate da mastiti subcliniche o da cause ambientali, possono essere presenti nel latte batteri patogeni, tra cui *Listeria monocytogenes*, da sempre considerata un pericolo a causa di episodi sporadici ed epidemici di listeriosi umana legati al consumo di latte e di prodotti lattiero-caseari fabbricati con latte crudo (1,2,3, 6,7,8,9).

Scopo del lavoro è stato quello di valutare la presenza di *Listeria monocytogenes* e di monitorare la flora aerobia a 30°C in latte crudo di bufala proveniente da diversi allevamenti e destinato alla produzione di mozzarella.

MATERIALI E METODI

Nell'arco di un anno sono state prelevate complessivamente, in 10 aziende registrate situate in

provincia di Caserta, n.207 unità campionarie (u.c.) di latte crudo di bufala, di cui n. 189 u.c. da singoli animali e n. 18 u.c. dal latte di massa (Tab.1).

I campioni di latte dei singoli animali sono stati prelevati direttamente nella sala di mungitura, alla fine dell'operazione medesima, dal contenitore di raccolta del latte; per il latte di massa il prelievo è stato eseguito alla fine delle operazioni di mungitura mattutina direttamente dal tank di refrigerazione. Immediatamente dopo il prelievo i campioni sono stati trasportati, in contenitore isotermico, al laboratorio di microbiologia della Sezione di Ispezione degli alimenti di origine animale per essere sottoposti alla ricerca della *Listeria monocytogenes* e della flora aerobia totale a 30°C, secondo metodiche validate (ISO , AFNOR).

RISULTATI

I dati relativi alla ricerca di *Listeria spp.* sono riportati nella Tabella n. 2. *Listeria monocytogenes* non è mai stata rinvenuta nel latte di massa. Nel latte di singoli soggetti è risultata presente in 2 u.c. dell'azienda n.5 ed in 5 u.c. dell'azienda n.1, due

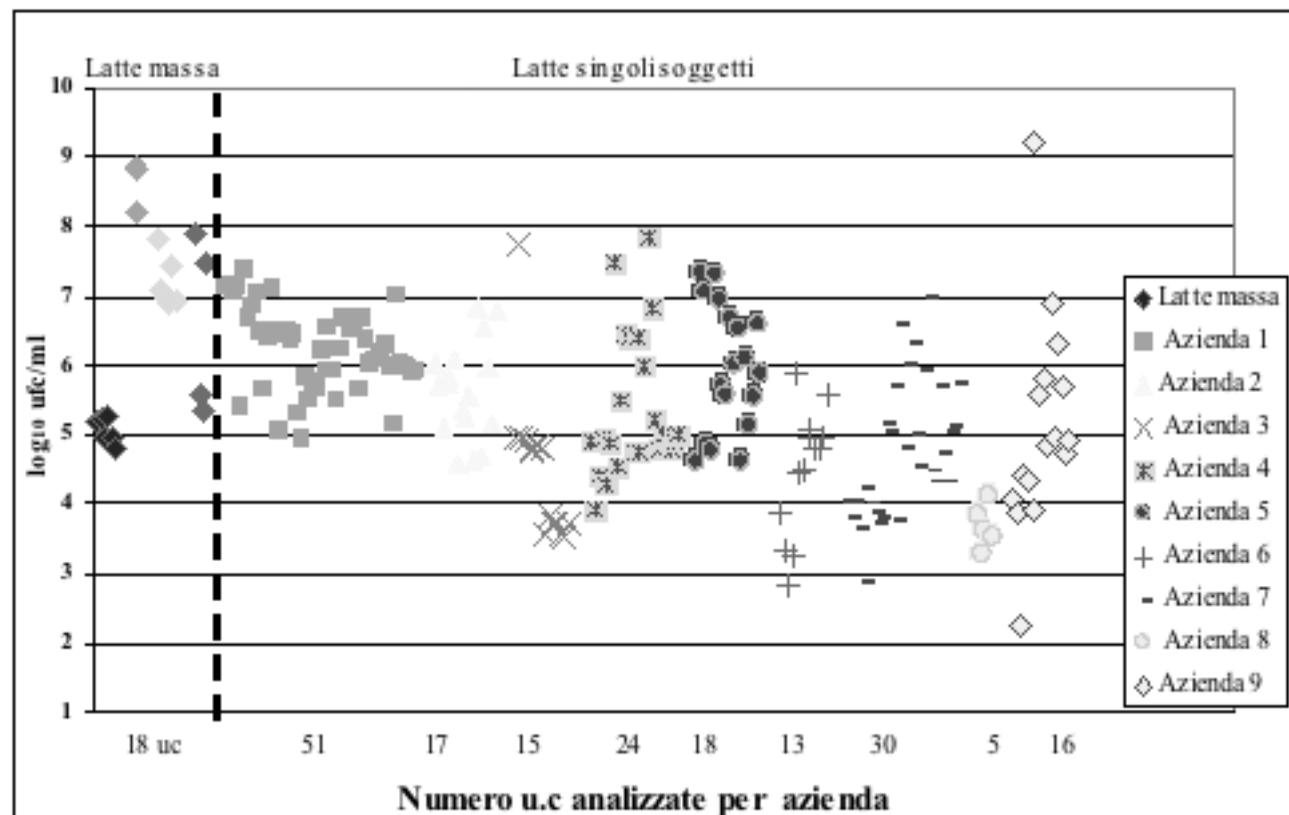
Tab. n.1 Unità campionarie di latte crudo per azienda

Azienda	singolo animale	latte di massa
. n.1	51	2
. n.2	17	-
. n.3	15	-
. n.4	24	6
. n.5	18	-
. n.6	13	-
. n.7	30	4
. n.8	5	-
. n.9	16	-
. n.10	-	6
Tot.	189	18

delle quali positive solo all'esame quantitativo, a livelli di 0,3 e 0,4 ufc/ml. Sono state anche isolate *Listeria innocua* (n. 35 u.c.) e *Listeria seeligeri* (n. 2 u.c.).

I risultati della carica batterica a 30°C sono riportati nel Grafico n. 1 e nella Tabella n.3.

Grafico n.1 Valori (ufc/ml) della flora aerobia a 30°C riscontrati nelle aziende controllate



Tab. n. 2 Presenza e livelli di *Listeria spp* per azienda in latte crudo di bufala

Azienda	<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria seeligeri</i>
	u.c.	25 ml	MPN/ml	25 ml	25 ml
n.1	51	3	0,4 0,3	6	neg
. n.2	17	neg	neg	1	neg
. n.3	15	neg	neg	1	neg
. n.4	24	neg	neg	18	neg
. n.5	18	2	neg	3	neg
. n.6	13	neg	neg	3	neg
. n.7	30	neg	neg	1	1
. n.8	5	neg	neg	neg	neg
. n. 9	16	neg	neg	neg	neg
Latte massa	18	neg	neg	2	1
Totale u.c.	207	5	2	35	2

Tab. n. 3 Valori min. e max e medi della flora aerobia a 30°C (ufc/ml) riscontrati in campioni di latte crudo di bufala

AZIENDE	UNITÀ CAMPONARIE	Flora aerobia a 30°C	
		min-max	medie
n.1	51	4.95-7.38	6.23
n.2	17	4.56 -6.83	5.63
n. 3	15	3.5 - 7.54	4.49
n. 4	24	3.93 -7.85	5.36
n. 5	18	4.6 - 7.34	5.94
n. 6	13	2.82 -5.88	4.47
n. 7	30	2.86 - 7.0	4.77
n. 8	5	3.28 - 4.1	3.66
n. 9	16	2.25 -9.23	5.11
Latte di massa	18	4.83-8.86	6.49

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Intento della ricerca è stato quello di monitorare la presenza di *Listeria monocytogenes* in produzione primaria, in un contesto nel quale non sono previsti controlli specifici per tale germe nel latte crudo, se non quando destinato al consumo umano diretto. I livelli di contaminazione, nei 2 campioni di latte crudo, prelevato per singolo animale nella azienda n. 1, positivi alla ricerca quantitativa, sono stati <1 ufc/ml.

Considerate anche le unità campionarie positive alla ricerca qualitativa è stata riscontrata una percentuale di isolamento del 3,38%. I livelli di contaminazione rinvenuti nei singoli animali concordano con quanto dimostrato da numerosi studi condotti

sulla contaminazione da *Listeria monocytogenes* nel latte crudo bovino di massa. E' da sottolineare che la percentuale di isolamento di *Listeria spp* si eleva al 21,25% se si considerano le unità campionarie positive per *Listeria innocua* e *seeligeri*, che condividono la stessa nicchia ecologica di *Listeria monocytogenes*. Allorché le concentrazioni di *Listeria monocytogenes* sono molto basse, come in questo caso, la fonte di contaminazione è solitamente di origine ambientale, e dovuta, ad esempio, alle feci, ad una scarsa igiene della mungitura o ad una mediocre qualità dei mangimi. Concentrazioni maggiori, superiori a 150 ufc/ml fino ad arrivare a 10000 ufc/ml, sono legate invece a mastiti subcliniche. Il livello di contaminazione da *Listeria monocytogenes* del latte riscontrato nel corso della ricerca è da considerare rassi-

curante dal punto di vista sanitario, in quanto questi livelli di contaminazione sono tenuti sotto controllo dalla pastorizzazione (8,10). Nel caso, invece, in cui il latte dovesse essere destinato crudo alla trasformazione, è da evidenziare che, studi condotti sulla sopravvivenza del microrganismo durante la produzione di mozzarella di bufala prodotta con latte crudo sperimentalmente inoculato, hanno dimostrato che nel prodotto finito è possibile isolare il microrganismo allorché il livello di contaminazione iniziale del latte superi il valore di 10^3 ufc/ml. I risultati confermano anche il carattere sporadico della contaminazione da *Listeria monocytogenes*. Gli isolamenti di *Listeria monocytogenes*, nella stessa azienda non sono relativi alla stessa giornata di campionamento, e quindi alle stesse condizioni di produzione ma, a prelievi effettuati a distanza di mesi tra l'uno e l'altro. La variazione nell'incidenza stagionale, emersa da numerosi studi, è generalmente minima nei mesi caldi e massima durante i mesi freddi. La possibilità di contaminazione del latte è legata a fattori e condizioni variabili che possono svolgere un ruolo anche sull'entità della contaminazione (9). Il monitoraggio va fatto quindi considerando le caratteristiche dell'azienda, i requisiti strutturali, la destinazione del latte, le procedure per la gestione delle buone prassi di lavorazione ed infine, ma non per questo meno importanti, i dati storici dell'azienda. Un altro aspetto strategico, che entra a pieno nel concetto di filiera voluto dalla normativa e sostenuto anche dal CODEX nel *Code d'usage en matière d'hygiène pour le lait et produit lactière (CAC/RCP 57-2004)*, è che il latte non deve contenere alcun contaminante ad una concentrazione tale da compromettere la salute pubblica. Questo significa che, anche se non vige alcun obbligo, in produzione primaria, a ricercare questo microrganismo, gli operatori del settore devono, attraverso le buone pratiche di lavorazione, ridurre al minimo le possibilità di contaminazione, monitorarne la presenza e comunicare ai trasformatori i risultati del monitoraggio, specialmente quando il latte è trasformato crudo.

La comunicazione dei dati tra le parti interessate può essere decisiva nel minimizzare le contaminazioni allorché l'allevatore informa i successivi responsabili della sua filiera (trasportatori, trasformatori, ecc) in maniera che questi possano mettere in atto anche procedure di sanificazione supplementari o l'eliminazione del batterio attraverso eventuali trattamenti termici del latte.

Nel corso della presente indagine è stata ricercata anche la carica batterica a 30°C, conformemente a quanto prescritto nel Regolamento (CE)

853/2004, che prevede, per il latte di specie diverse da quella vaccina, un limite generale $\leq 1.500.000$ e di ≤ 500.000 ufc/ml, se destinato alla produzione di prodotti a latte crudo. Detti valori vanno controllati con una frequenza di almeno due prelievi al mese e calcolati con media geometrica mobile su un periodo di due mesi. Per quanto la frequenza dei controlli, le modalità di calcolo e la tipologia di prodotto (prelievo da singolo animale e non da latte di massa) non siano quelli dettati dalla normativa, i risultati evidenziano che il primo è stato superato dal 30,4% dei campioni, mentre il secondo dal 42,02% dei campioni. Sebbene non sia stata osservata alcuna correlazione diretta tra i livelli di flora aerobia a 30°C e la contaminazione da *Listeria spp.*, i dati ottenuti evidenziano la necessità di migliorare le condizioni igieniche e quindi il management a livello di produzione primaria.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Cantoni C., Sbizzera F., La listeriosi nel latte e nei suoi derivati. Aspetti igienico-sanitari e compiti del veterinario. 1994 *Obbiettivi e Documenti Veterinari* n. 3. 23-31.
- 2) Fedio W.M. and Jackson H., Incidence of *Listeria monocytogenes* in raw bulk milk in Alberta. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 1990 (23) n. 4, 236-238.
- 3) Fedio W.M., Schoonderwoerd M., Shute R. H., Jackson H., (1990) A case of bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*. *Can. Vet. Journal* (31) 1990 773-775.
- 4) G.U. dell'Unione Europea L226/3 del 27.6.2004 Regolamento (CE) n. 852/2004 del parlamento Europeo e del Consiglio del 29 Aprile 2004 sull'Igiene dei prodotti alimentari.
- 5) G.U. dell'Unione Europea L226/3 del 27.6.2004 Regolamento (CE) n. 853/2004 del parlamento Europeo e del Consiglio del 29 Aprile 2004 sull'Igiene dei prodotti alimentari.
- 6) Jayarao B.M. and Henning D.R., Prevalence of Food-borne pathogens in Bulk tank Milk. *J. Dairy Sci.* 2001 (84) 2157-2162
- 7) Jensen N.E., Aarestrup F.M., Jensen J., Wegener H. C., *Listeria monocytogenes* in bovine mastitis. Possible implication for human health. *International Journal of Food Microbiology* (32) 1996 209-216.
- 8) Meyer-Broseta S., Diot A., Bastian S., Rivière J., Cerf O., (2003) Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. *International Journal of Food Microbiology* (80) 2003 1-15.
- 9) Rawool D.B., Malik S.V.S., Shakuntala I., Sahare A.M., Barbuddhe S.B., (2007) Detection of multiple virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases. *International Journal of Food Microbiology* (113) 2007 201-207.10. Ruegg P.L., Practical food safety Interventions for dairy Production. *J. Dairy Sci.* 2003 (86) E1-E9