



LA NOSTRA  
ESPERIENZA,  
LA VOSTRA  
**SICUREZZA.**



# Comportamento di *Listeria* ed *E.coli* VTEC in prodotti a latte crudo

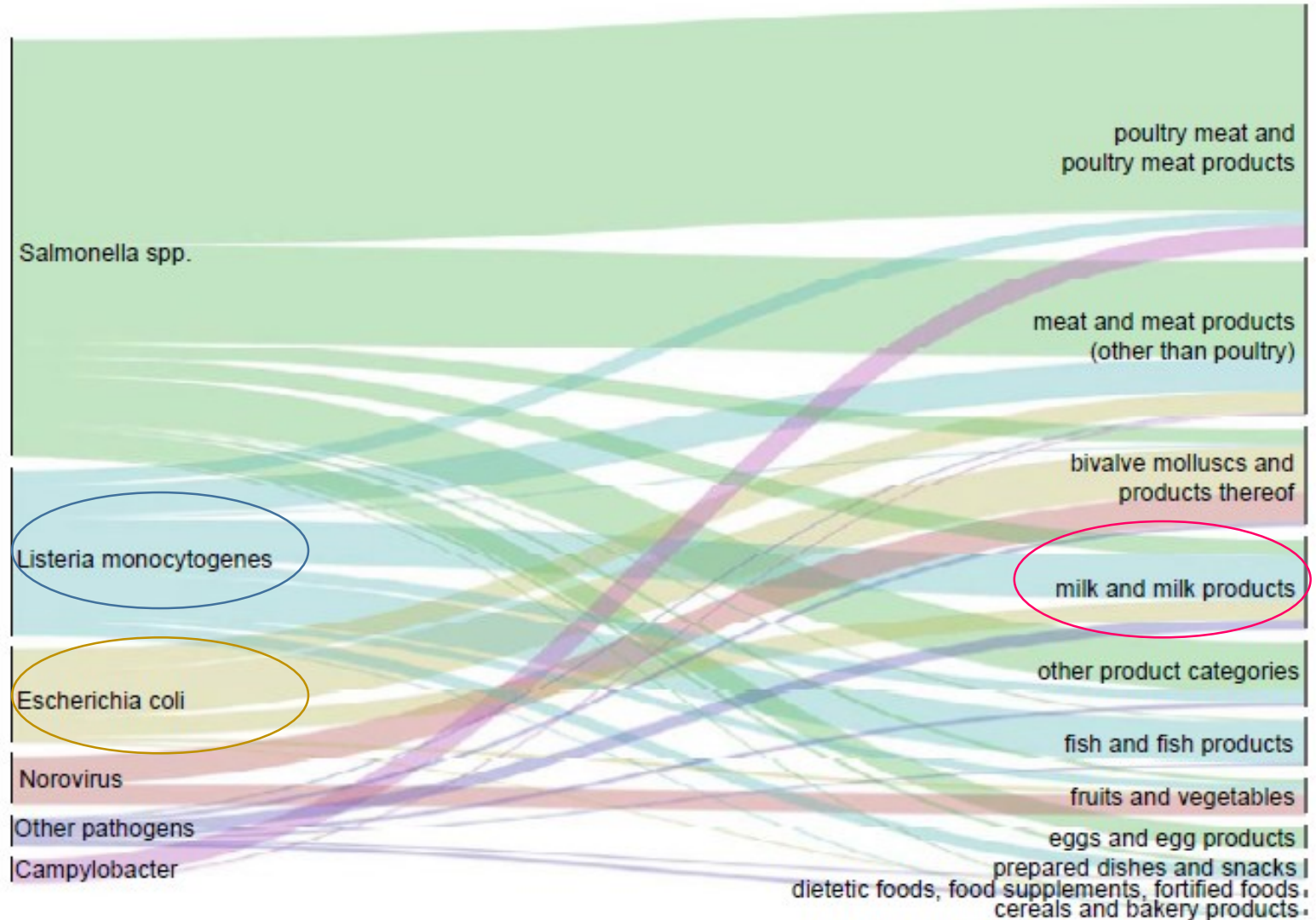


# Patogeni vs alimenti (2017)

The Rapid Alert System  
for Food and Feed

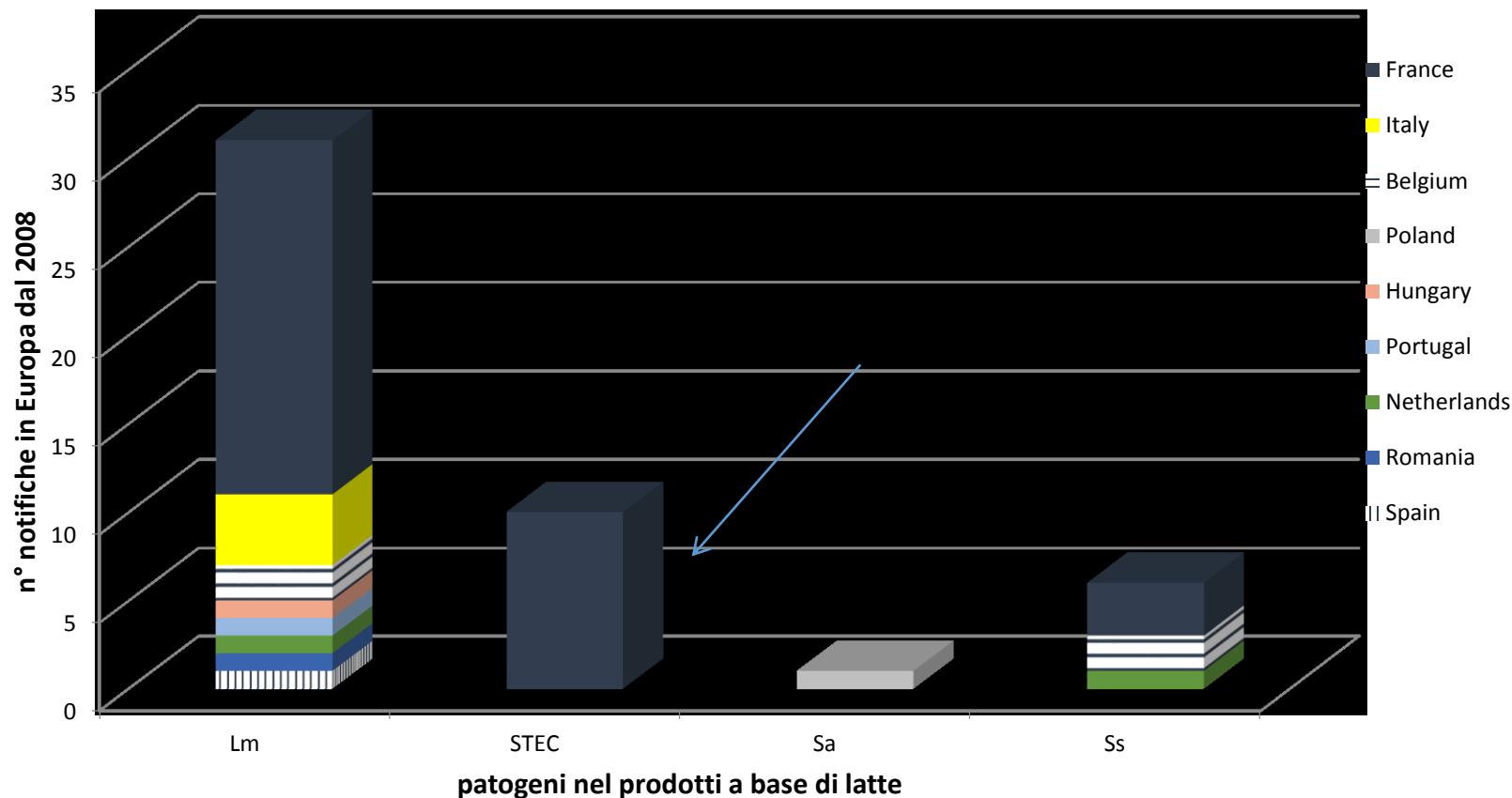
2017 Annual Report

- Sankey diagram





# 2017-2018 notifiche Rasff



*Listeria monocytogenes* (Lm); *Escherichia coli* verocitotossico (STEC)





# Lm e STEC prodotti a base di latte

457 formaggi in Italia (OJ 147 26-6-2007)

Trova l'intruso????!!

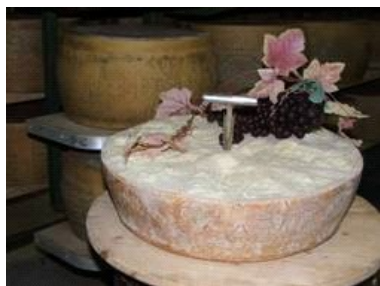
latte

coagulazione

Taglio cagliata

spurgo

stagionatura



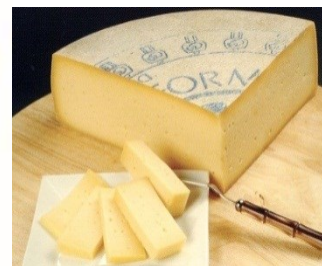
Grana Padano



Provolone



Gorgonzola



Formai de Mut



Stracchino



# Dinamica di comportamento



- Quali sono le variabili che influenzano la dinamica di comportamento dei patogeni nei formaggi?
- Caratteristiche del pericolo microbiologico
- Variabili estrinseche → temperatura/ MAP
- Variabili intrinseche → pH, aw, [LAB]

Lo studio della dinamica di comportamento di un microrganismo negli alimenti deve prendere in considerazione le **proprietà intrinseche ed estrinseche degli alimenti e caratteristiche del pericolo biologico considerato.**



## Fasi del processo: Shelf life *L. monocytogenes*

Da quali variabili principali dipende la concentrazione finale?

- Distribuzione della concentrazione batterica iniziale
- Distribuzione della fase lag (batterica)
- Distribuzione della temperatura di conservazione

Quali variabili possiamo considerare costanti?

- valori pH
- valori aw
- concentrazione indigena (batteri acido lattici, LAB)



# Reg CE 2073/2005 Criteri di sicurezza

*L. monocytogenes*: prodotti che non supportano la crescita

–  $\text{pH} \leq 4.4$  o  $\text{aw} \leq 0.92$ ,  $\text{pH} \leq 5.0$  e  $\text{aw} \leq 0.94$

– Prodotti freschi (meno di 5 gg)

– Prodotti nei quali è dimostrato scientificamente che il patogeno non si sviluppa

Lo studio per verificare il rispetto dei criteri di sicurezza (ad es. *Listeria monocytogenes*) negli alimenti permette di definire l'appartenenza di un alimento ad una definita categoria (Reg. Ce 2073/2005); i risultati di tale studio :

**Devono essere validati attraverso l'analisi continua del trend dei parametri**



## Fasi del processo: cheese making e stagionatura *E. coli* e (*L. monocytogenes*)

Da che cosa dipende la concentrazione finale?

- Distribuzione della concentrazione batterica iniziale
- Distribuzione della fase lag/ shoulder (batterica)

Quali variabili non si possono considerare costanti?

- temperatura durante il cheese making (latte e cagliata)
- valori pH (acidificazione)
- valori aw (stagionatura)
- concentrazione batterica competitiva (batteri lattici LAB)





# Reg CE 2073/2005

## Criteri di igiene di processo



Per i formaggi **che non costituiscono terreno favorevole** alla crescita di *E. coli*, il conteggio di *E. coli* è abitualmente **massimo all'inizio del periodo di maturazione**, mentre per i formaggi **che costituiscono terreno favorevole** alla crescita di *E. coli*, ciò si verifica abitualmente **alla fine del periodo di maturazione**.



# Mezzi per l'analisi dei dati



- Come valutare la modulazione della concentrazione?
  - Letteratura
  - Banche dati
  - Modelli matematici di microbiologia predittiva
  - Challenge test

Per applicare il modello matematico di microbiologia predittiva durante un processo di produzione? **Si devono conoscere le caratteristiche chimico fisiche del prodotto durante il processo di produzione**



# Prevalenza *Lm* e STEC nel latte crudo

- Prevalenza nel nord Italia:
  - *Lm* 2010-13 → 2.22% (latte per caseificazione)
  - STEC 2008-14 → 0.15% (latte al distributore)

346 *European Journal of Public Health*, Vol. 26, Supplement 1, 2016

## STEC prevalence in raw milk cheese produced in Lombardia

Barbara Bertasi

G Finazzi<sup>1</sup>, B Bertasi<sup>1</sup>, A Vitali<sup>2</sup>, MN Losio<sup>1</sup>, G Varisco<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Microbiology Department, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italy

<sup>2</sup>General Health Veterinary Directorate, Lombardy Region, Milano, Italy

<sup>3</sup>National Reference Center for emerging risks in food safety, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Milano, Italy

Contact: barbara.bertasi@izsler.it

Food Control 60 (2016) 466–470

Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)



ELSEVIER



Survey of prevalence and seasonal variability of *Listeria monocytogenes* in raw cow milk from Northern Italy

Elena Dalzini<sup>a,\*</sup>, Valentina Bernini<sup>b</sup>, Barbara Bertasi<sup>c</sup>, Paolo Daminelli<sup>a</sup>, Marina-Nadia Losio<sup>c</sup>, Giorgio Varisco<sup>a</sup>

<sup>a</sup>National Reference Centre for Emerging Risk in Food Safety, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini", Brescia, Italy

<sup>b</sup>Department of Food Science, University of Parma, Parco Area delle Scienze 49/A, 43124, Parma, Italy

<sup>c</sup>Department of Food Microbiology, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini", Brescia, Italy



*Zoonoses and Public Health*, 2017, 64,

**Paediatric HUS Cases Related to the Consumption of Raw Milk Sold by Vending Machines in Italy: Quantitative Risk Assessment Based on *Escherichia coli* O157 Official Controls over 7 years**

F. Giacometti<sup>1</sup>, P. Bonilauri<sup>2</sup>, S. Piva<sup>1</sup>, G. Scavia<sup>3</sup>, S. Amatiste<sup>4</sup>, D. M. Bianchi<sup>5</sup>, M. N. Losio<sup>6</sup>, S. Bilei<sup>4</sup>, G. Cascone<sup>7</sup>, D. Comin<sup>8</sup>, P. Daminelli<sup>6</sup>, L. Decastelli<sup>5</sup>, G. Merialdi<sup>9</sup>, R. Mioni<sup>8</sup>, A. Peli<sup>1</sup>, A. Petruzzelli<sup>10</sup>, F. Tonucci<sup>10</sup>, G. Liuzzo<sup>11</sup> and A. Serraino<sup>1</sup>



# Letteratura e Banche dati



- Google scholar

Behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw milk Cantal type **cheeses** during **cheese making**, ripening and storage in different packaging conditions

C Chatelard-Chauvin, F Pelissier, S Hulin, MC Montel - Food control, 2015 - Elsevier

The aim of this study was to run challenge tests to investigate the behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw milk Cantal type uncooked pressed **cheeses** throughout the **cheese** process and during storage in different packagings (stretch film, vacuum packs and kraft ...

[HTML] Influence of stress factors related to **cheese-making** process and to **STEC** detection procedure on the induction of Stx phages from **STEC O26: H11**

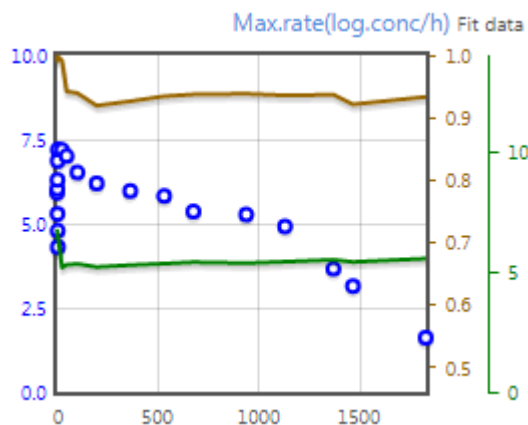
L Bonanno, B Delubac, V Michel, F Auvray - Frontiers in microbiology, 2017 - frontiersin.org

**Shiga** toxin-producing *Escherichia coli* (**STEC**) are responsible for human infections, ranging from mild watery diarrhea to hemorrhagic colitis (CH) that may be complicated by hemolytic uremic syndrome (HUS). The main **STEC** virulence factor is **Shiga** toxin encoded ...

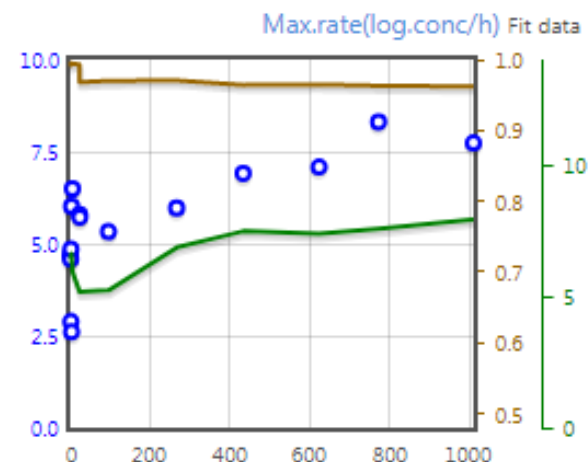
☆ 97 Citato da 1 Articoli correlati Tutte e 6 le versioni Web of Science: 1 >>

- Combase ([www.comase.cc](http://www.comase.cc))

Lm in gouda Cheese



Lm in Brie Cheese







# Modelli predittivi alimento specifici

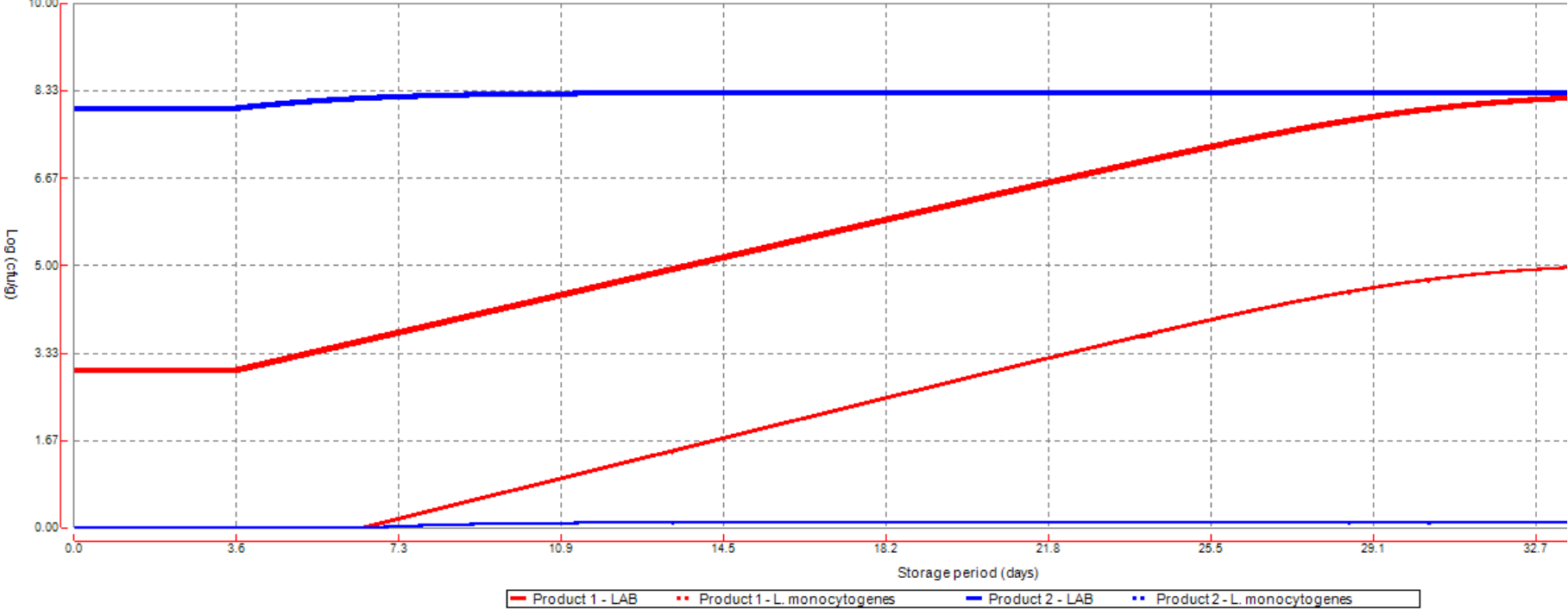
Listeria monocytogenes, cfu/g	<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="1"/>	Temperature (°C)	<input type="text" value="8"/>	<input type="text" value="8.0"/>
Lactic acid bacteria, cfu/g	<input type="text" value="1000"/>	<input type="text" value="100000000"/>	Salt in water phase of product, %	<input type="text" value="1.11"/>	<input type="text" value="1.11"/>
LAB aroma culture used	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Initial pH	<input type="text" value="5.2"/>	<input type="text" value="5.2"/>
Worst case relative lag time	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Lactic acid in water phase of product, mg/l	<input type="text" value="1000"/>	<input type="text" value="1000"/>
Storage period (d)	<input type="text" value="40"/>		Sorbic acid in waterphase of product, mg/l	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="0"/>
<input type="button" value="Apply"/>		<input type="button" value="Clear"/>			

FSSP (<http://fssp.food.dtu.dk/>)

Constant temperature
  Series of constant temperatures
  Temperature profiles from logger data

Listeria monocytogenes			Lactic acid bacteria				
	Growth rate $\mu_{max}$ (1/h)	Lag phase (d)	Time for 100-fold increase (d)		Growth rate $\mu_{max}$ (1/h)	Lag phase (d)	Time to reach 8.0 log cfu/g (d)
Product 1	0.0203	6.42	15.89	Product 1	0.0189	3.57	30.46
Product 2	0.0203	6.42	Not reached	Product 2	0.0189	3.57	3.57

Predicted growth of *L. monocytogenes* and LAB





# Modelli predittivi alimento specifici

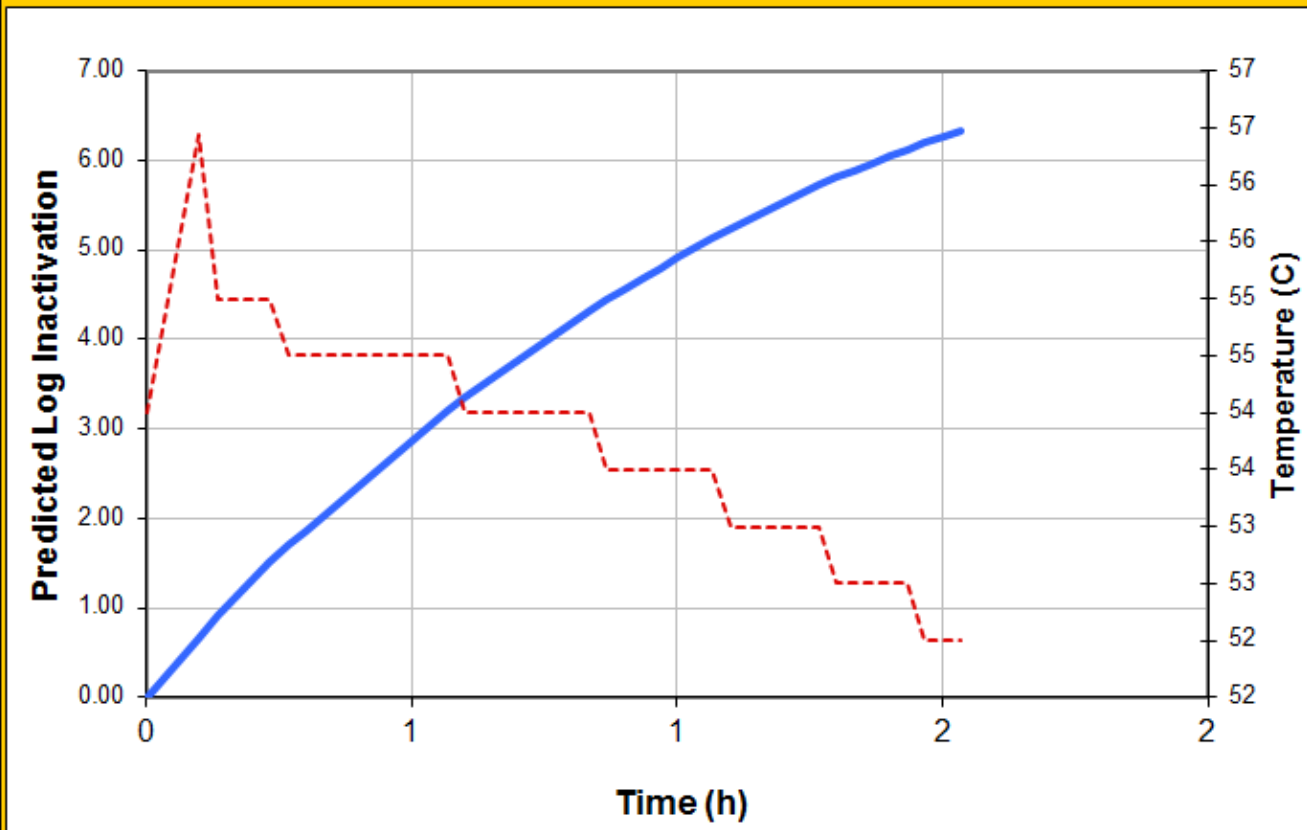
Enter Your Data Here

**E. coli INACTIVATION PREDICTIONS**



**6.33** Total Predicted Inactivation (log CFU)

Temperature (°C)	Time (hours) Since Measurements Started
54.0	
56.4	0.1
55.0	0.133333333
55.0	0.233333333
54.5	0.266666667
54.5	0.3
54.5	0.566666667
54.0	0.6
54.0	0.833333333
53.5	0.866666667
53.5	0.9
53.5	0.933333333
53.5	0.966666667
53.5	1
53.5	1.033333333
53.5	1.066666667
53.0	1.1
53.0	1.266666667
52.5	1.3
52.5	1.333333333
52.5	1.366666667
52.5	1.4
52.5	1.433333333
52.0	1.466666667



Quinto et al. (2014) App Environ Microbiol 27

— Predicted Total Inactivation



# Modelli predittivi in terreni culturali

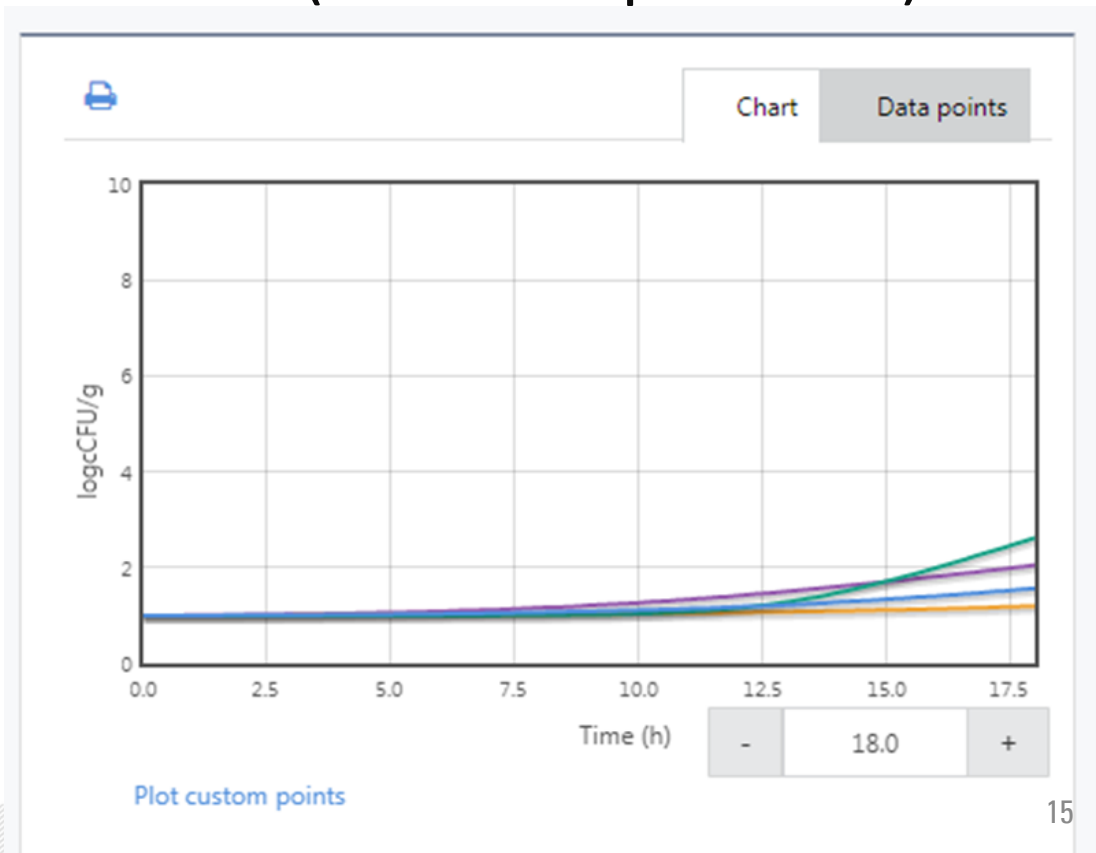
- Varia la concentrazione di patogeni nel latte crudo conservato a 18°C per 12 ore?
- sguardo ai modelli matematici (Combase predictor)
- Competizione?

*E. coli* STEC;

*S. aureus*;

*L. monocytogenes*;

*Cl. botulinum* np



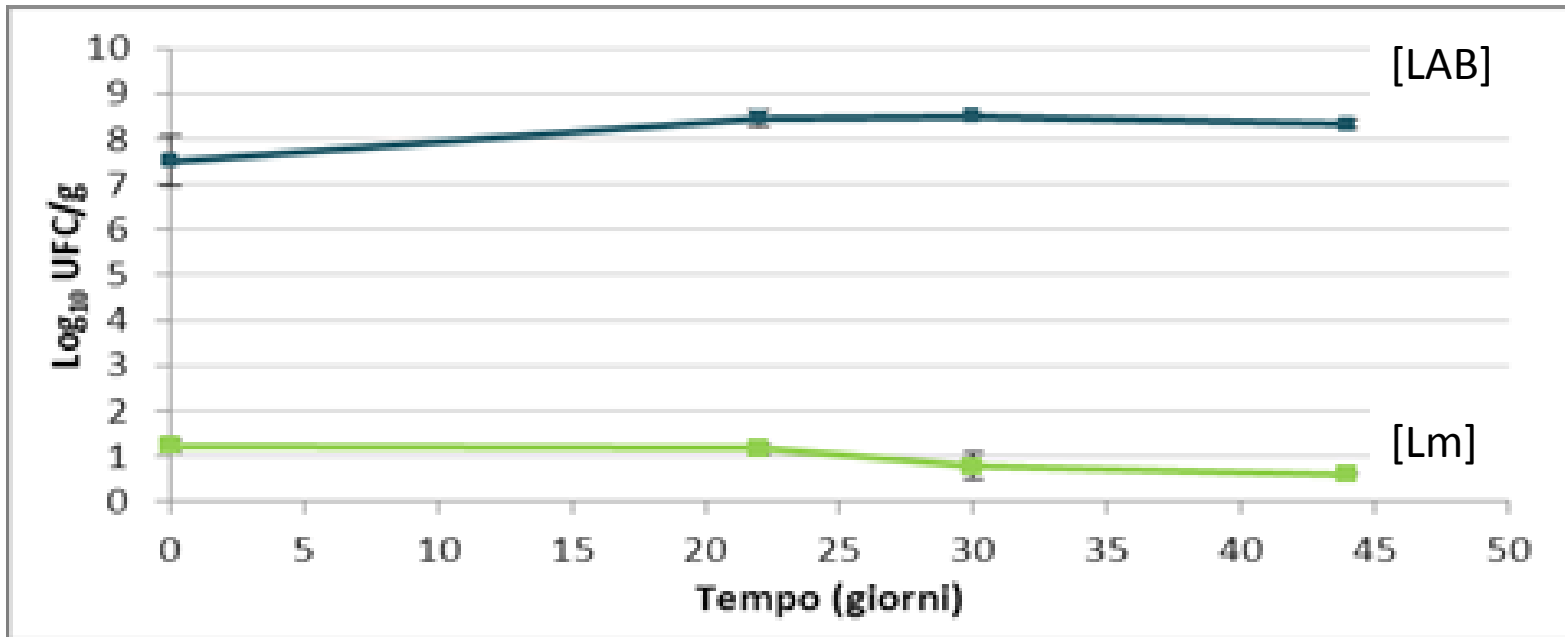


# Challenge test *Lm*: shelf life



Formaggio altipiano porzionato in atm

pH 5.49+/-0.05; aw 0.964+/-0.002; Temp 8°C per 7 gg 12°C per 38 gg







# Challenge test *Lm*: shelf life



Contents lists available at ScienceDirect  
International Journal of Food Microbiology

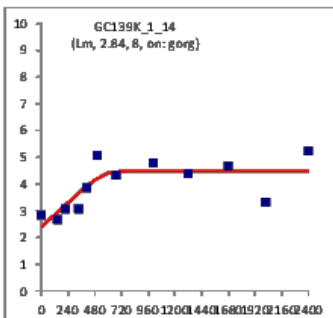
journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)



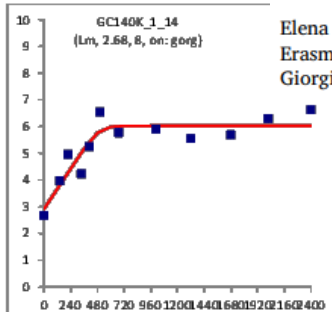
*Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheese: Study of the behaviour throughout the process and growth prediction during shelf life

Elena Dalzini<sup>a,b,\*</sup>, Elena Cosciani-Cunico<sup>a,b</sup>, Paola Monastero<sup>a,b</sup>, Valentina Bernini<sup>c,d</sup>, Erasmo Neviani<sup>c,d</sup>, Alberto Bellio<sup>e</sup>, Lucia Decastelli<sup>e</sup>, Marina-Nadia Losio<sup>b</sup>, Paolo Daminelli<sup>a,b</sup>, Giorgio Varisco<sup>a</sup>

ceppo ATCC  
240 1



ceppo wild



lotto 1

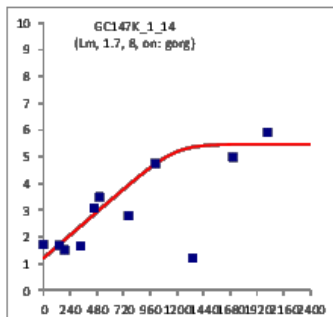
## Formaggio Gorgonzola

pH 6.3+/-0.26;

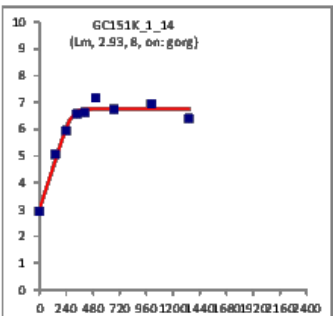
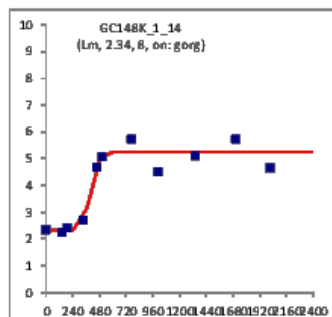
aw 0.974+/-0.007;

LAB 7.48+/-0.27

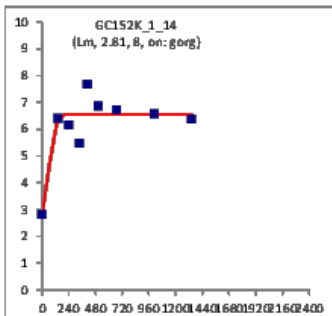
Temp 8°C per 7 gg 12°C per 93 gg)



lotto 2



lotto 3



Co	time (days) to 100 cfu/g at:	
	8°C	4°C
1/25(cfu/g)	22.47	61.56

time (h)

100 giorni



# Challenge test: ingredienti



- Contaminazione sperimentale con concentrazioni note di patogeni di interesse
- Diverse fasi del processo
- **A che cosa serve un challenge test?**
  - validare i modelli di microbiologia predittiva
  - calcolare l'errore (valore bias) tra il modello ed il dato reale
  - calcolare il fattore di correzione da applicare al modello perché la predizione si avvicini maggiormente al valore reale

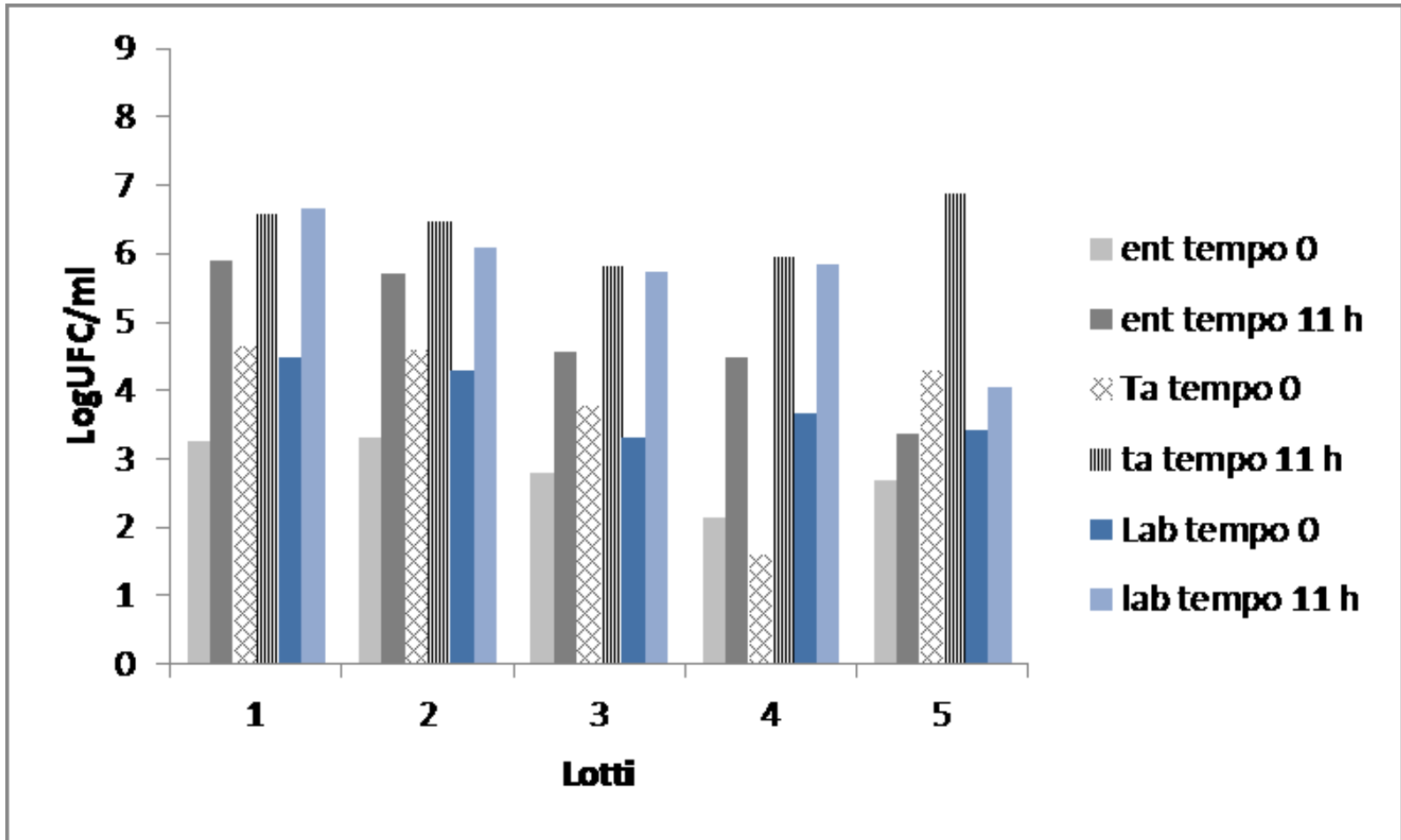
Il challenge test è utile per:  
**tutte e tre le risposte**



# Challenge test: ingredienti



- Latte crudo-Carica indigena





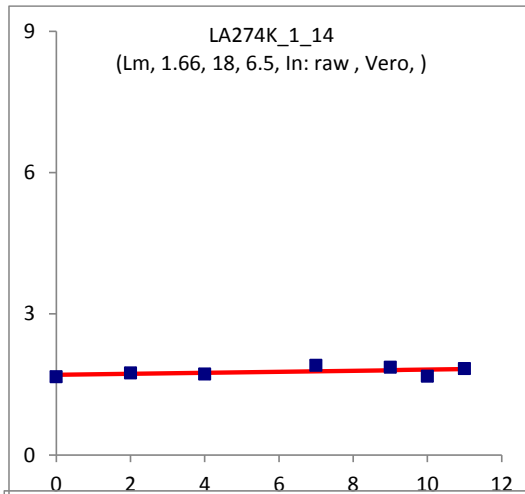
# Lm e STEC nel latte



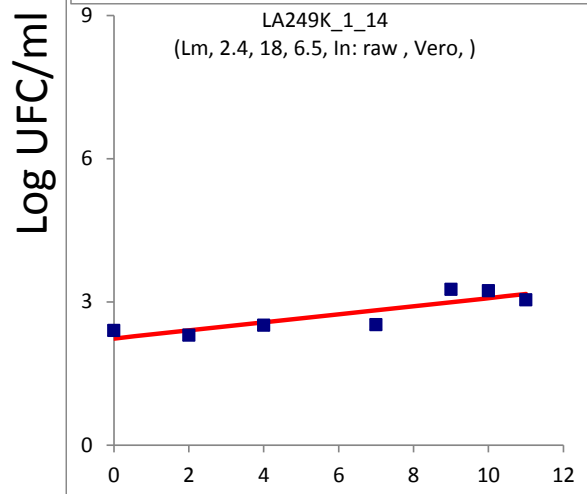
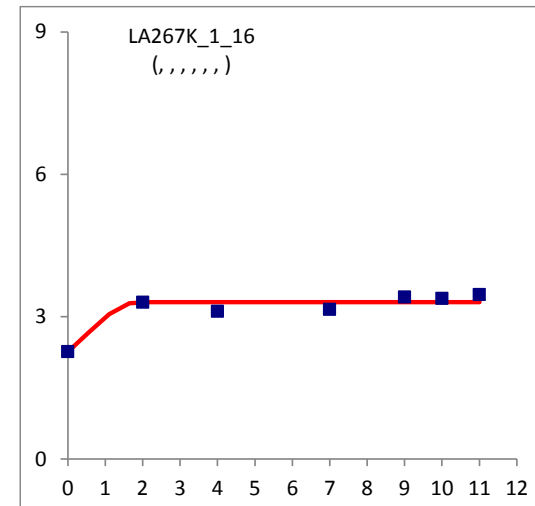
Latte crudo conservato a Temperatura permissiva (~ 18°C)

Lm

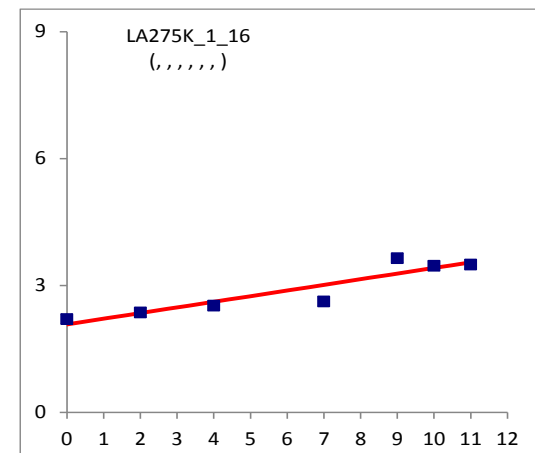
STEC



Lotto 5



Lotto 4



Tempo (ore)

Tempo (ore)





# Challenge test: processo



*Ital J Food Saf.* 2014 Jan 21; 3(1): 2243.  
Published online 2014 Feb 4. doi: [10.4081/ijfs.2014.2243]

PMCID: PMC5076674  
PMID: 27800324

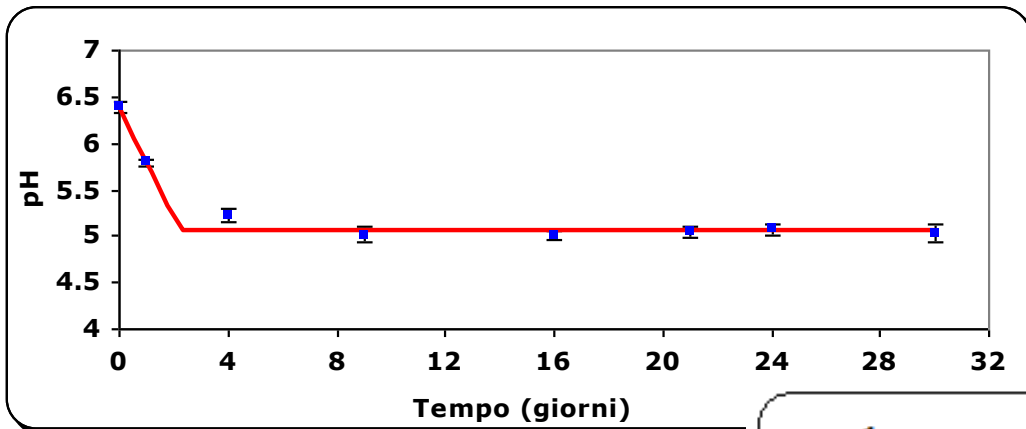
Behaviour of *Escherichia Coli* O157:H7 During the Manufacture and Ripening of an Italian Traditional Raw Goat Milk Cheese

Elena Cosciani-Cunico,<sup>001</sup> Elena Dalzini,<sup>1</sup> Stefano D'Amico,<sup>1</sup> Chiara Sfameni,<sup>1</sup> Barbara Bertasi,<sup>1</sup> Marina Nadia Losio,<sup>1</sup> Federica Giacometti,<sup>2</sup> and Paolo Daminelli<sup>1</sup>

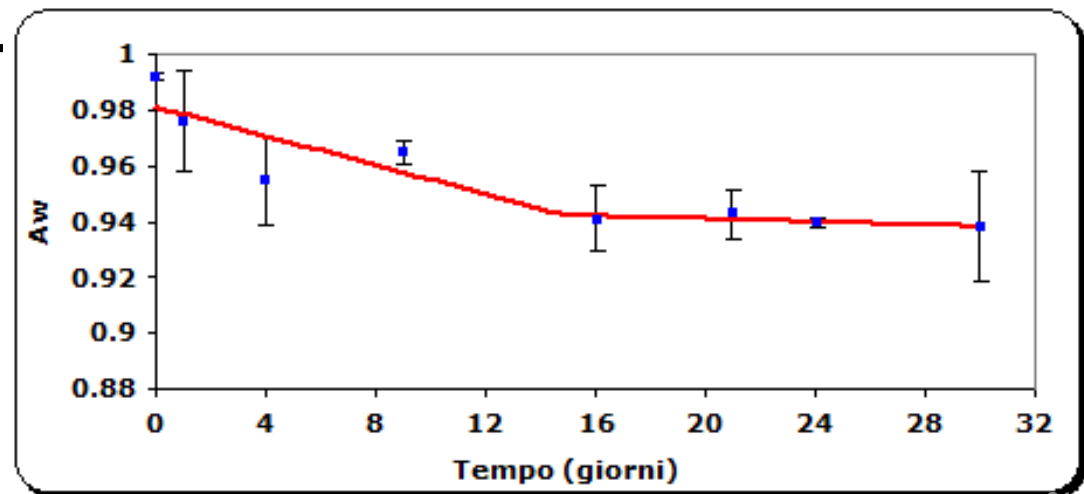
• Author information • Article notes • Copyright and License information [Disclaimer](#)

## Formaggio «fresco»

## Formaggella del Luinese



Temperatura della lavorazione 20°C  
Dal 2° giorno 12°C

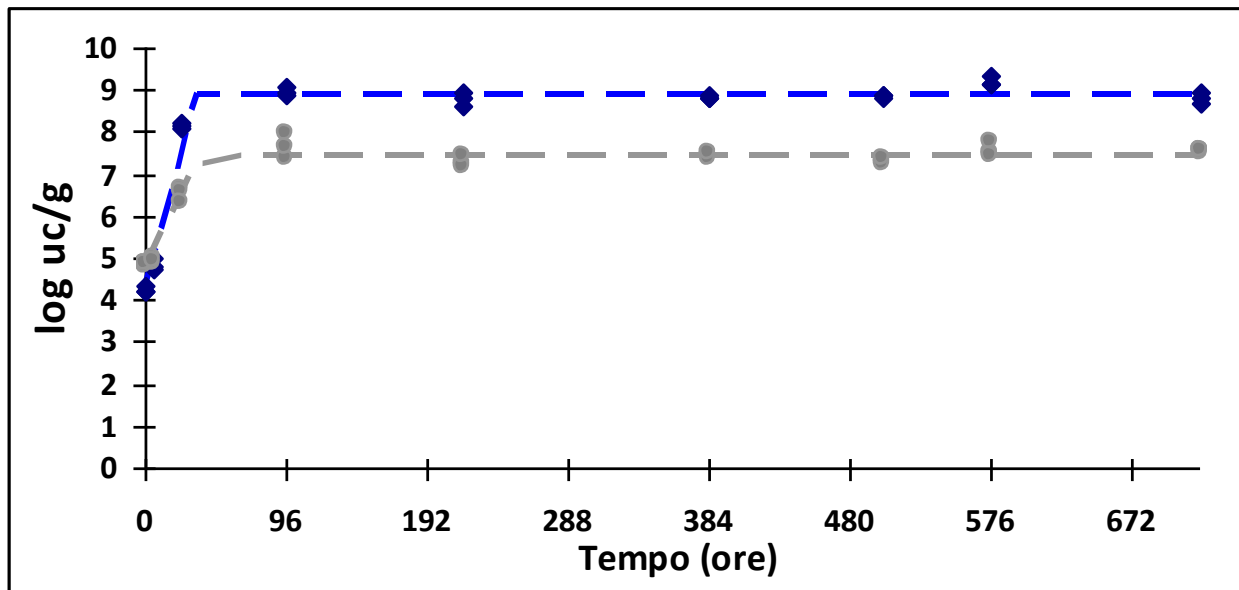




# Dinamica STEC nel formaggio «fresco»



- Competizione batterica Lab vs STEC

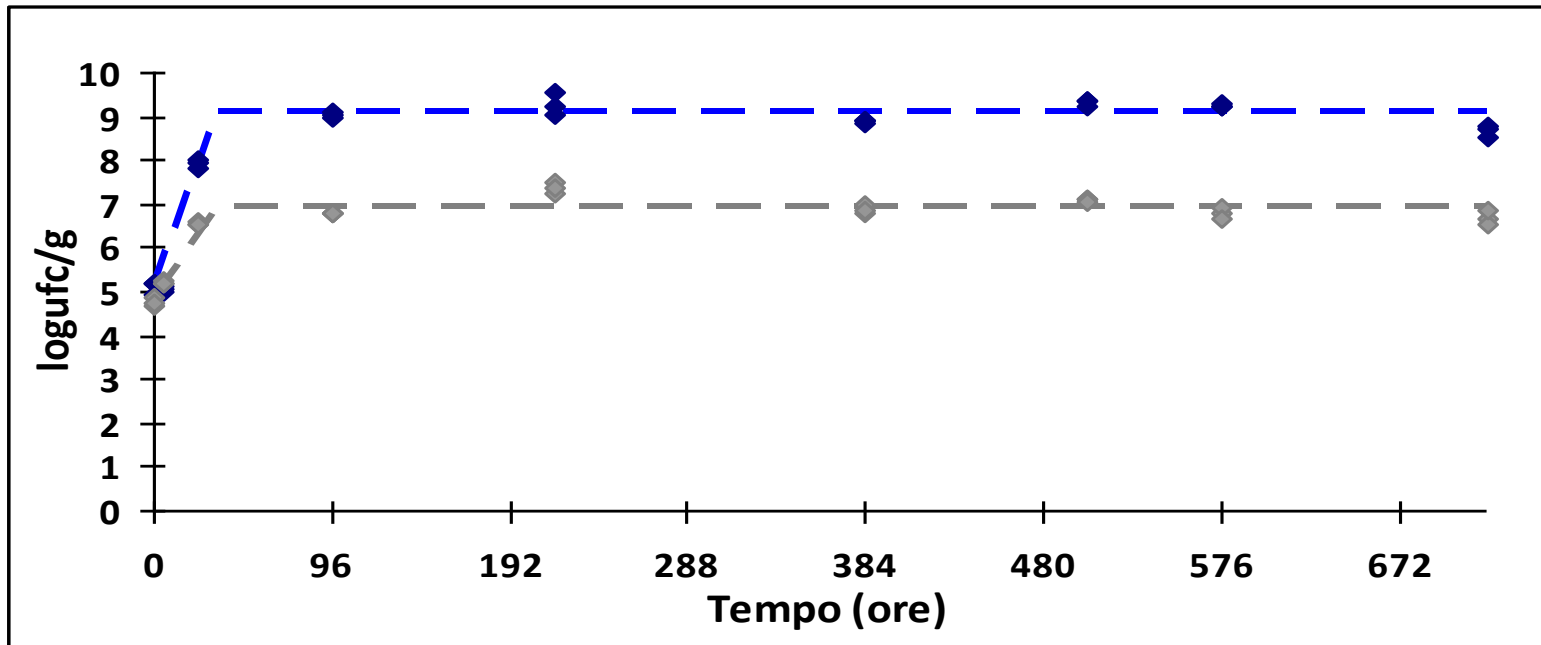




# Dinamica *Lm* nel formaggio «fresco»



- Competizione batterica Lab vs *Lm*





# Challenge test: processo



*Ital J Food Saf.* 2015 Jun 30; 4(3): 4585.  
Published online 2015 Sep 30. doi: [10.4081/ijfs.2015.4585](https://doi.org/10.4081/ijfs.2015.4585)

PMCID: PMC5076637  
PMID: [27800408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27800408/)

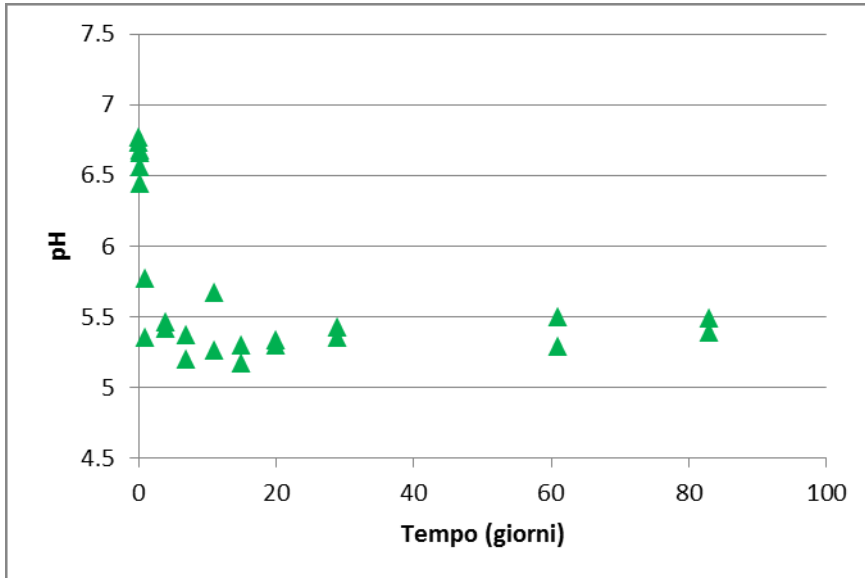
Behaviour of *Listeria Monocytogenes* and *Escherichia Coli* O157:H7  
During the Cheese Making of Traditional Raw-Milk Cheeses from Italian  
Alps

[Elena Cosciani-Cunico](#)<sup>✉1</sup> [Elena Dalzini](#)<sup>1</sup> [Stefania Ducoli](#)<sup>1</sup> [Chiara Sfameni](#)<sup>1</sup> [Barbara Bertasi](#)<sup>1</sup>  
[Marina-Nadia Losio](#)<sup>2</sup> [Paolo Daminelli](#)<sup>1</sup> and [Giorgio Varisco](#)<sup>1</sup>

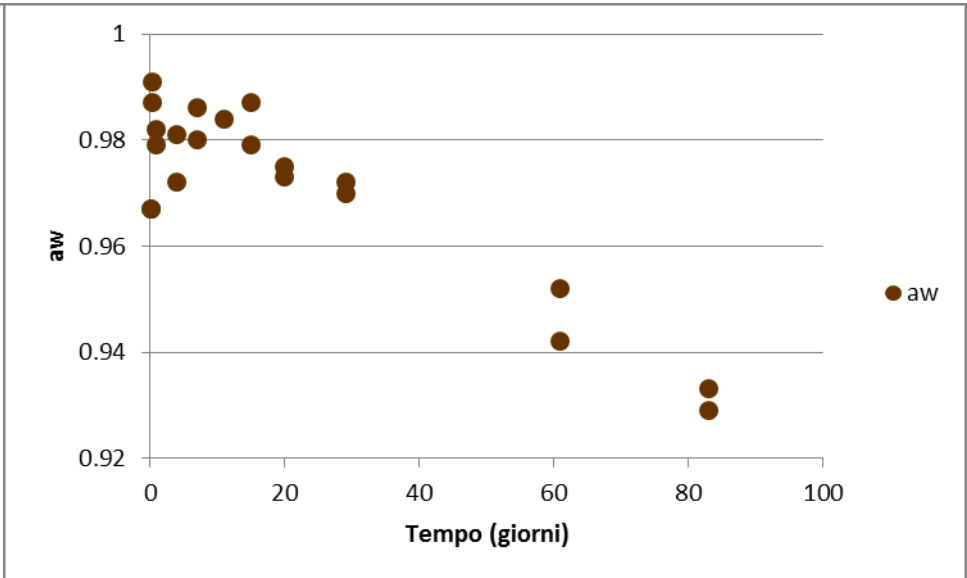
[Author information](#) · [Article notes](#) · [Copyright and License information](#) [Disclaimer](#)

## Formaggio «fresco» stracchino Valsassina

pH



aw

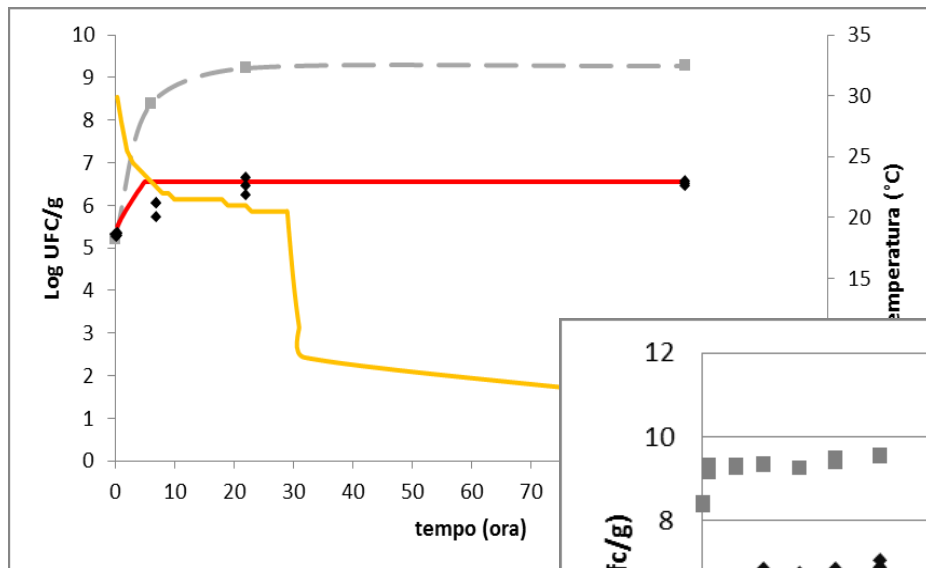






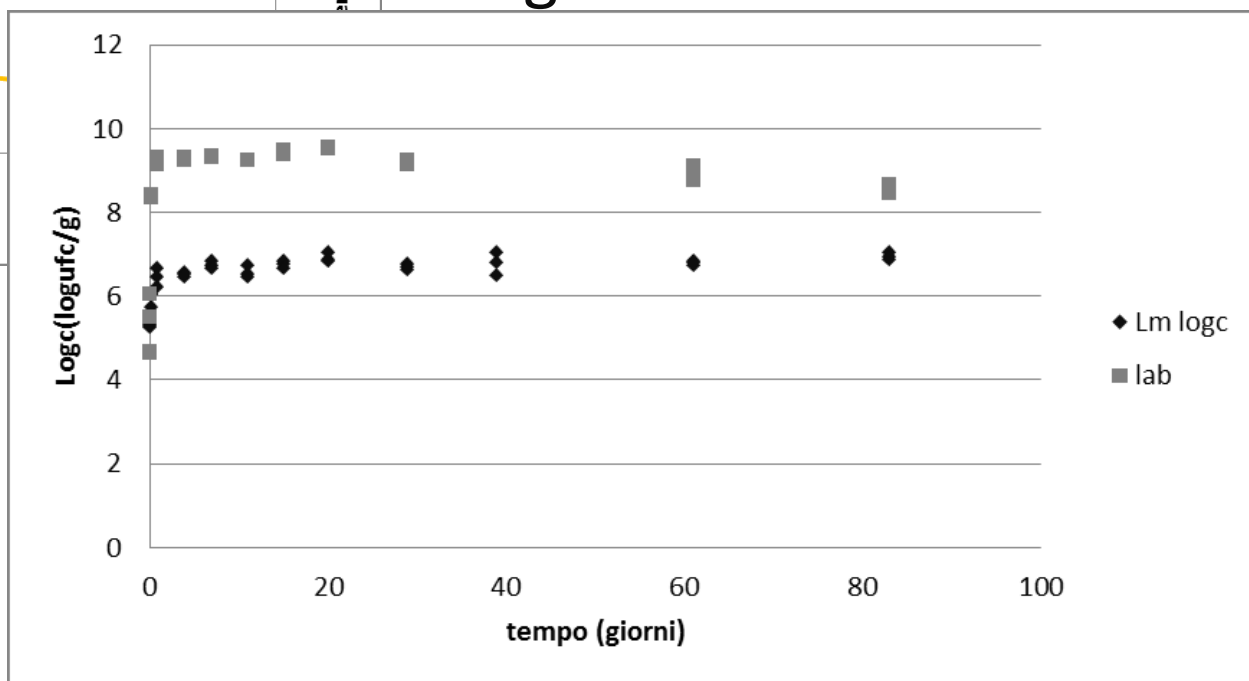
# Dinamica Lm nel formaggio «fresco»

## caseificazione



stagionatura

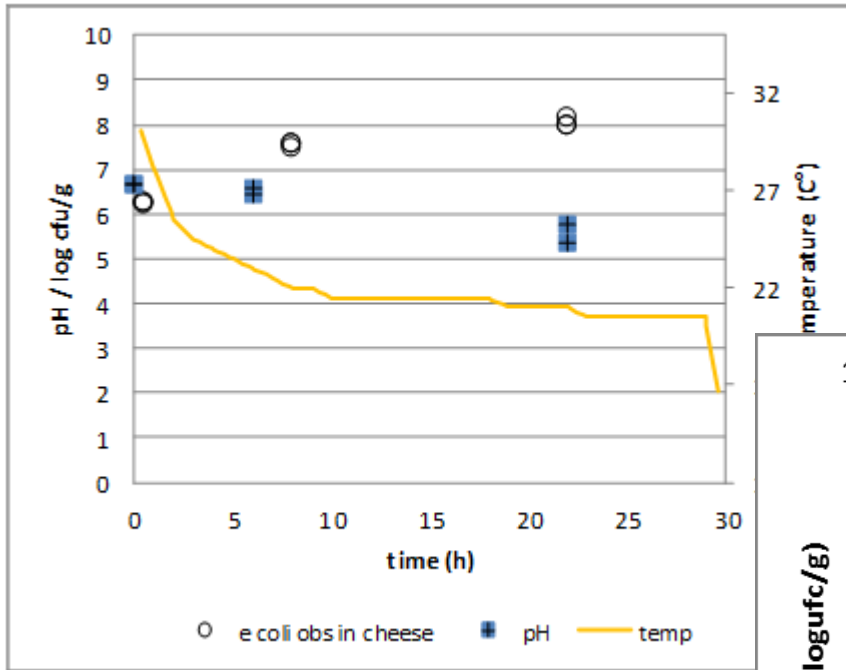
Temp 10°C





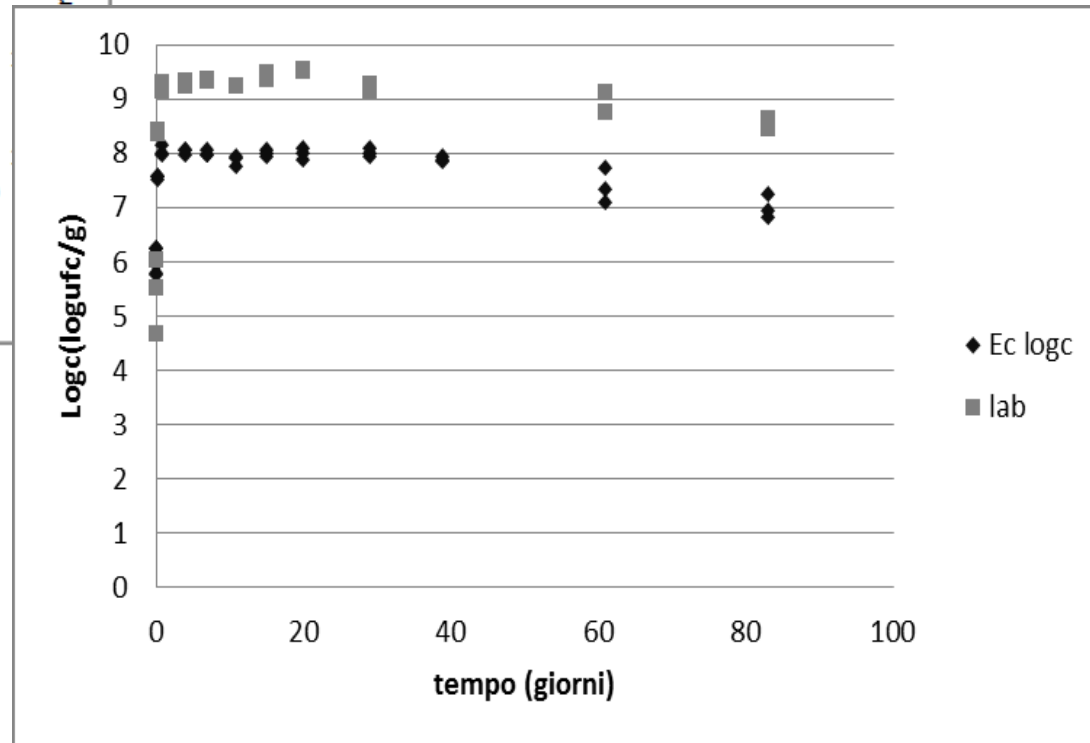
# Dinamica STEC nel formaggio «fresco»

## Caseificazione



stagionatura

Temp 10°C





# Challenge test: processo



[Ital J Food Saf](#). 2015 Jun 30; 4(3): 4585.  
Published online 2015 Sep 30. doi: [\[10.4081/jfs.2015.4585\]](#)

PMCID: PMC5076637  
PMID: [27800408](#)

Behaviour of *Listeria Monocytogenes* and *Escherichia Coli* O157:H7  
During the Cheese Making of Traditional Raw-Milk Cheeses from Italian Alps

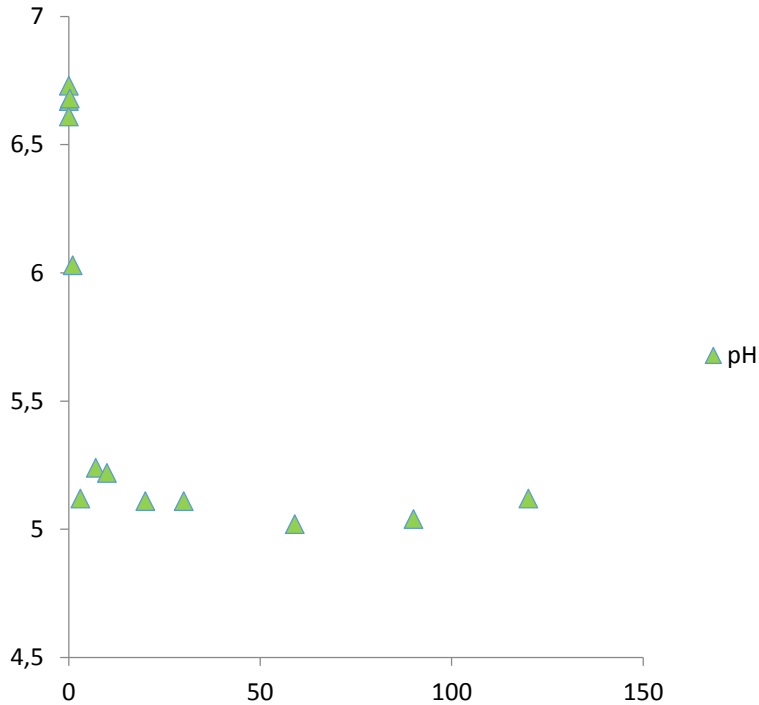
[Elena Cosciani-Cunico](#),<sup>1</sup> [Elena Dalzini](#),<sup>1</sup> [Stefania Ducoli](#),<sup>1</sup> [Chiara Sfameni](#),<sup>1</sup> [Barbara Bertasi](#),<sup>1</sup>  
[Marina-Nadia Losio](#),<sup>2</sup> [Paolo Daminelli](#),<sup>1</sup> and [Giorgio Varisco](#)<sup>1</sup>

[Author information](#) · [Article notes](#) · [Copyright and License information](#) [Disclaimer](#)

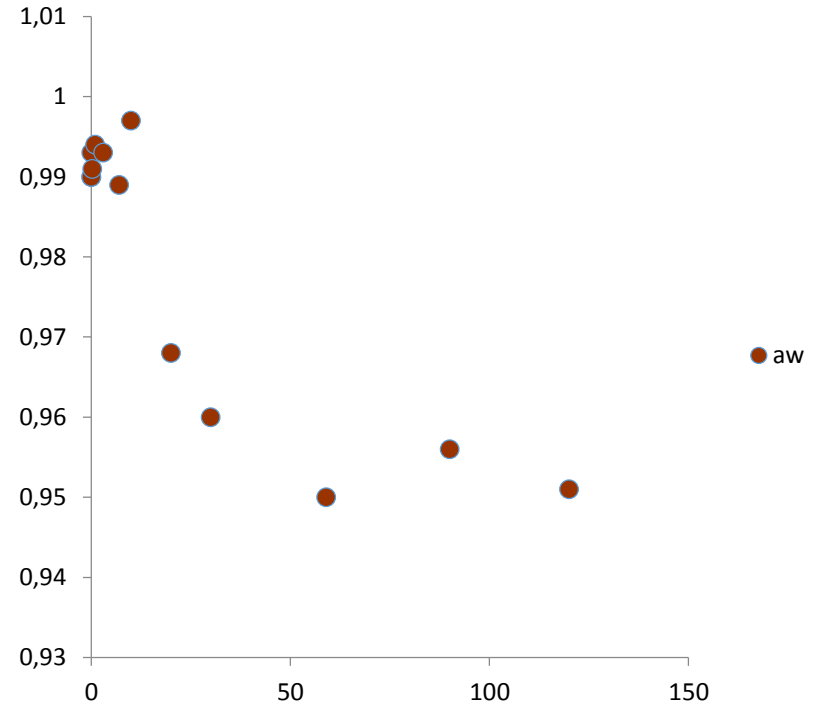
## Formaggio «stagionato»

## Formai de Mut

pH



aw

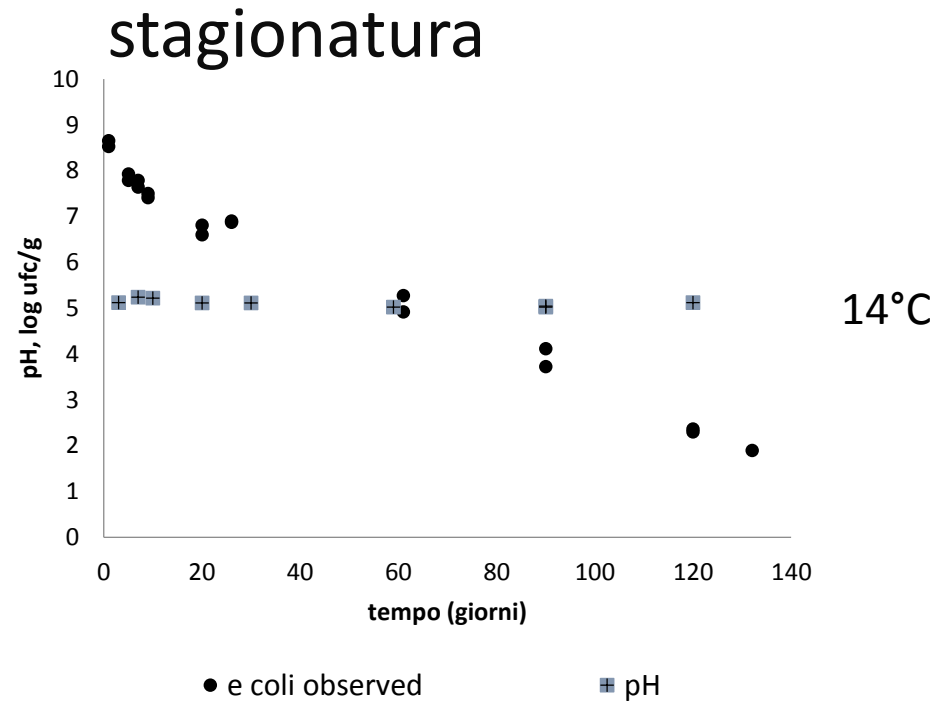
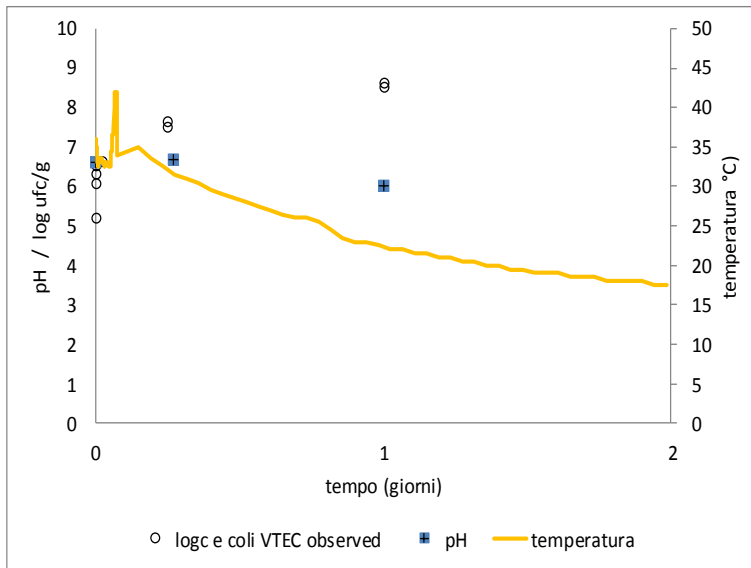


Tempo (giorni)



# Dinamica STEC nel formaggio «stagionato»

## Caseificazione

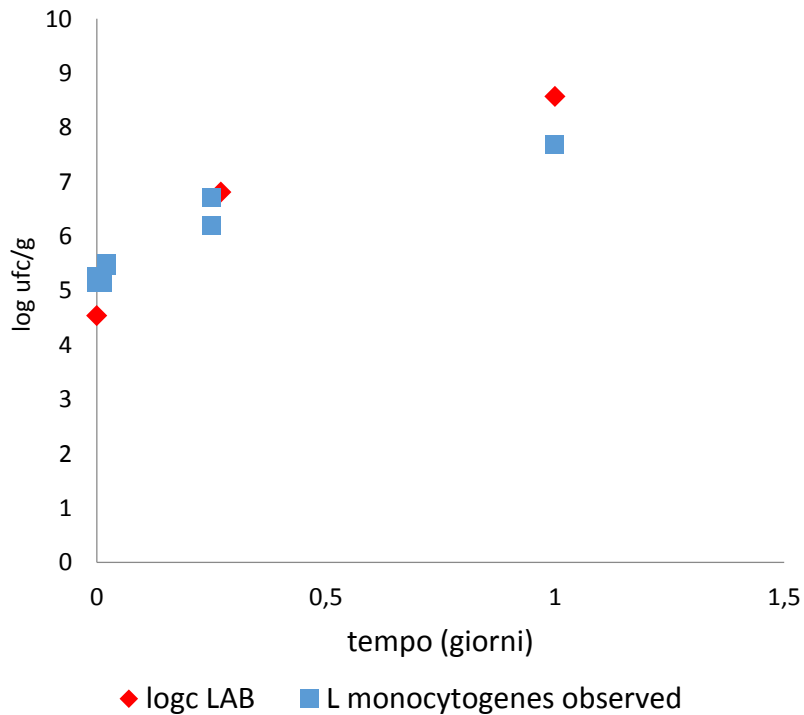




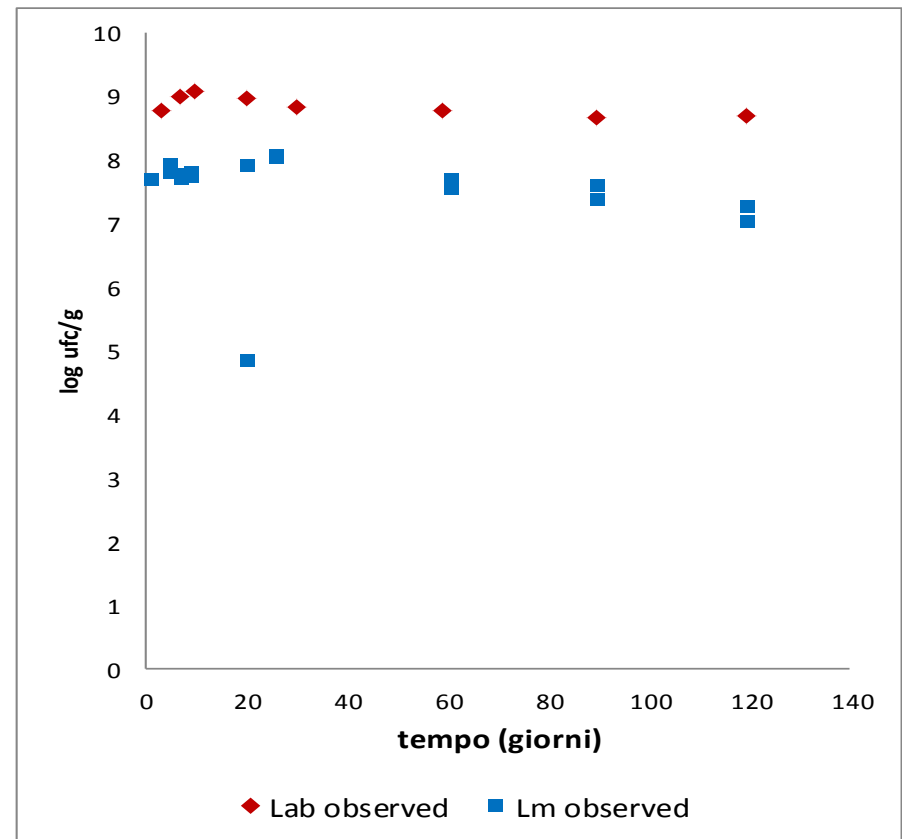
# Dinamica *Lm* nel formaggio «stagionato»



## Caseificazione



## Stagionatura



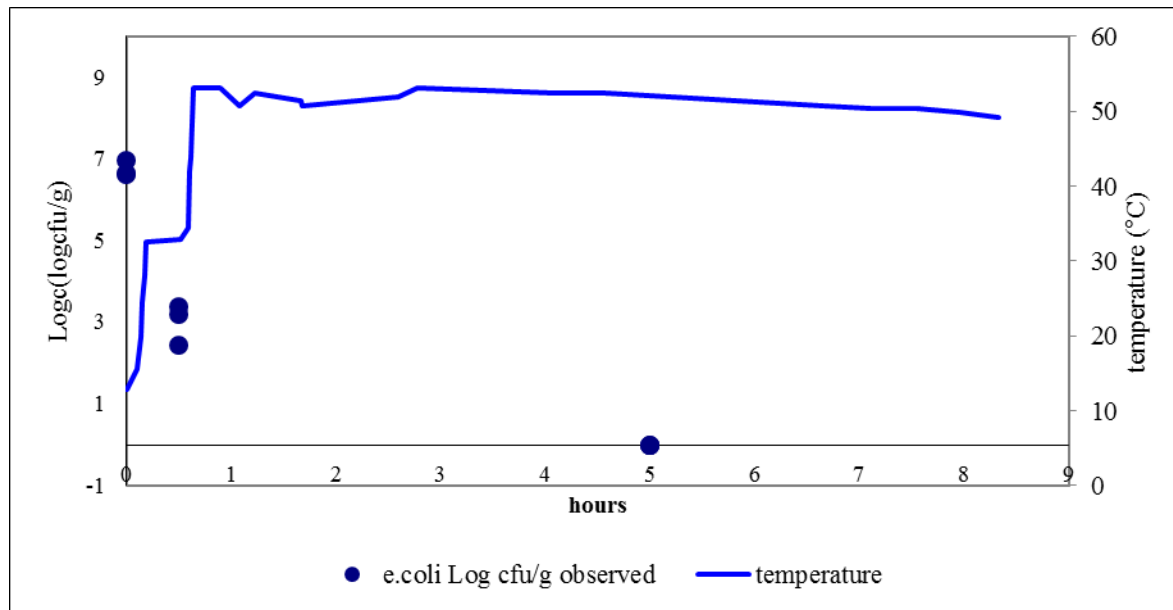




# Dinamica STEC nel formaggio «stagionato»

Grano Padano

caseificazione



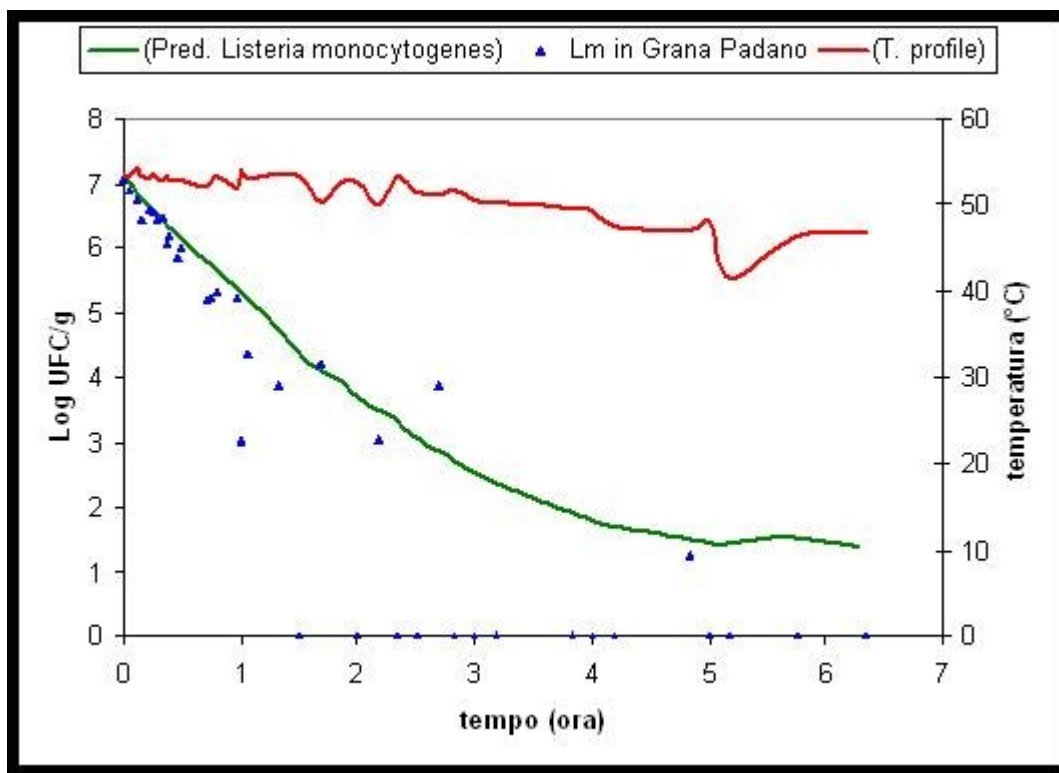


# Dinamica *Lm* nel formaggio «stagionato»



Grano Padano

caseificazione



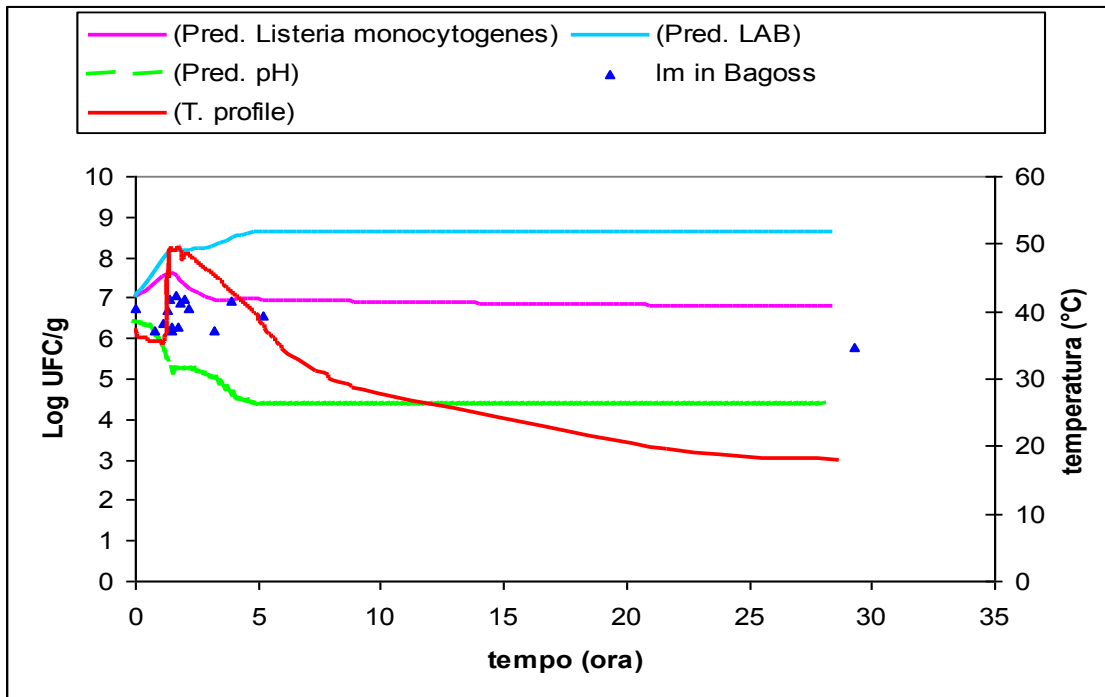


# Dinamica *Lm* nel formaggio «stagionato»



## Lm in Formaggio a pasta cotta caseificazione

## Bagoss



[Lm] non cambia

Temperatura cottura <50°C

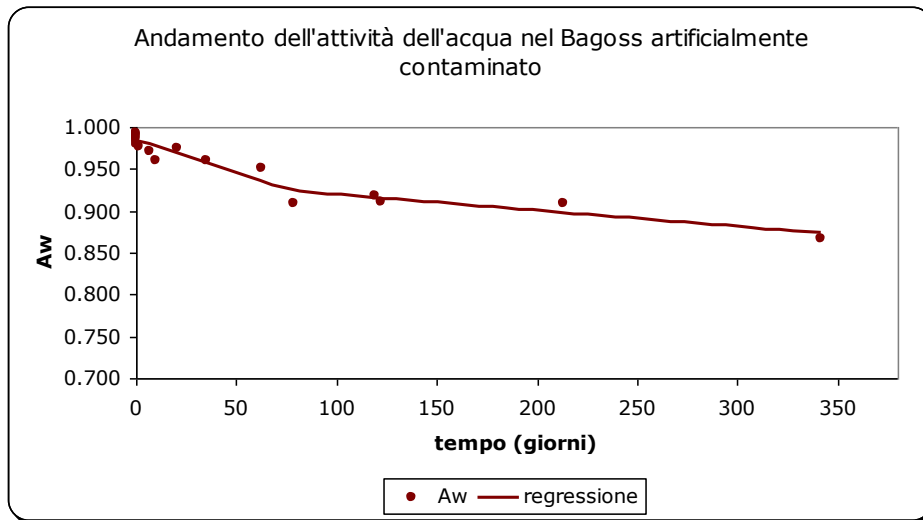


# Dinamica *Lm* nel formaggio «stagionato»

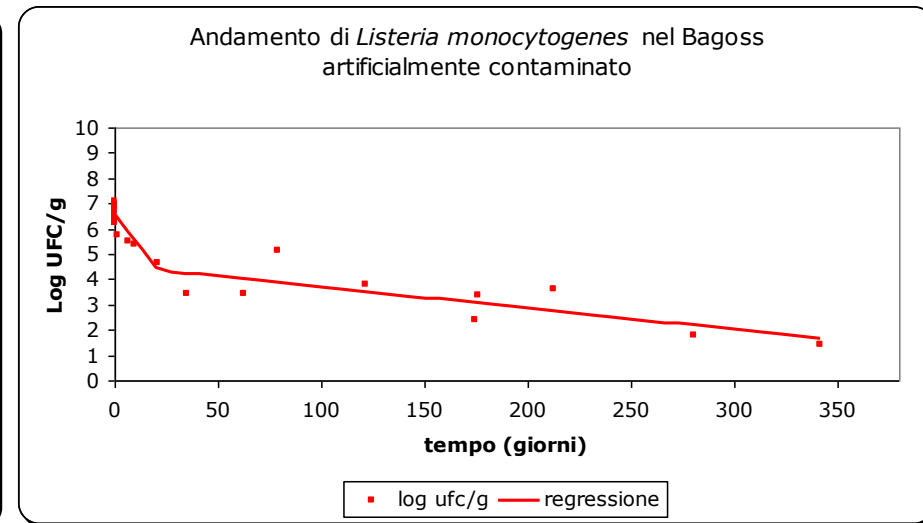


Stagionatura pH<5.3; temp ~12°C

$a_w$  diminuisce



[*Lm*] diminuisce

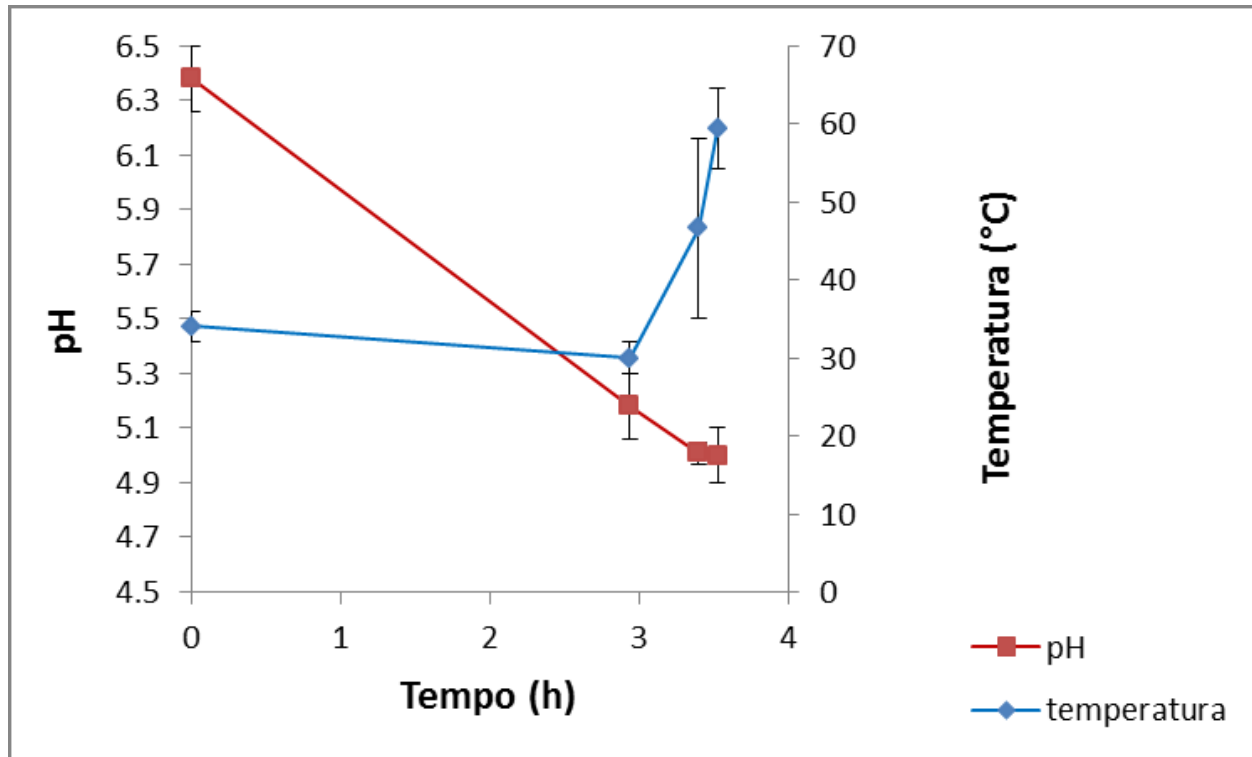




# Caratterizzazione del processo



- Provolone < 12kg
- 10 aziende
- Temperatura acqua  $64.5 \pm 4.5^\circ\text{C}$
- Durata  $9.07 \pm 2.27$







# Challenge test: processo



Inserimento cagliata  
nella macchina filatrice



Pasta filata ✓



Messa negli stampi



Messa negli stampi

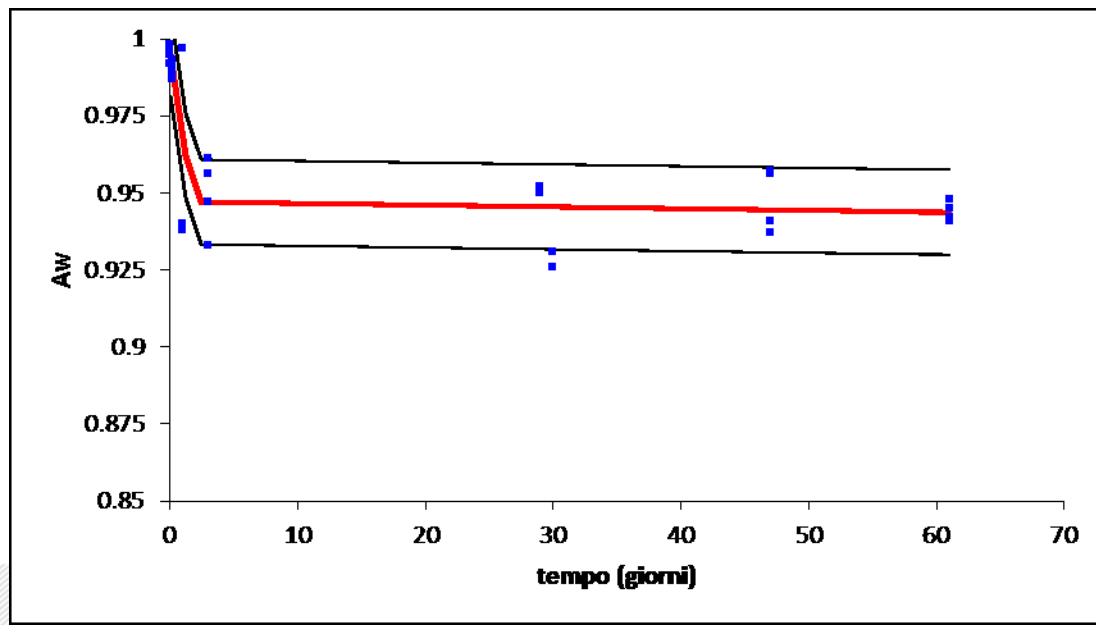
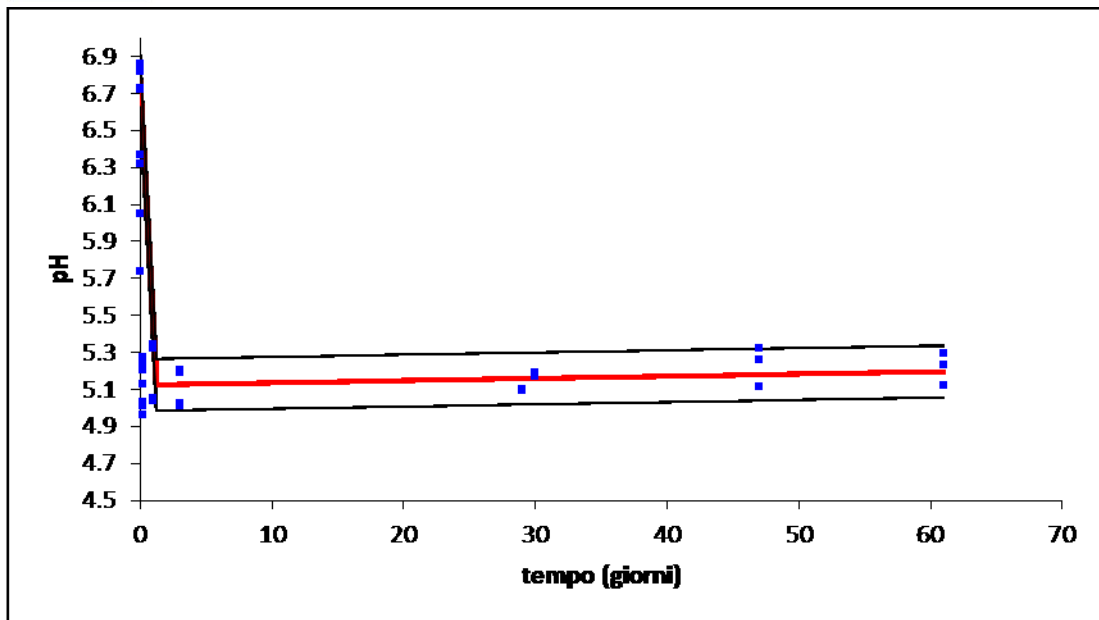


raffreddamento

Sosta in salamoia



# Challenge test: processo



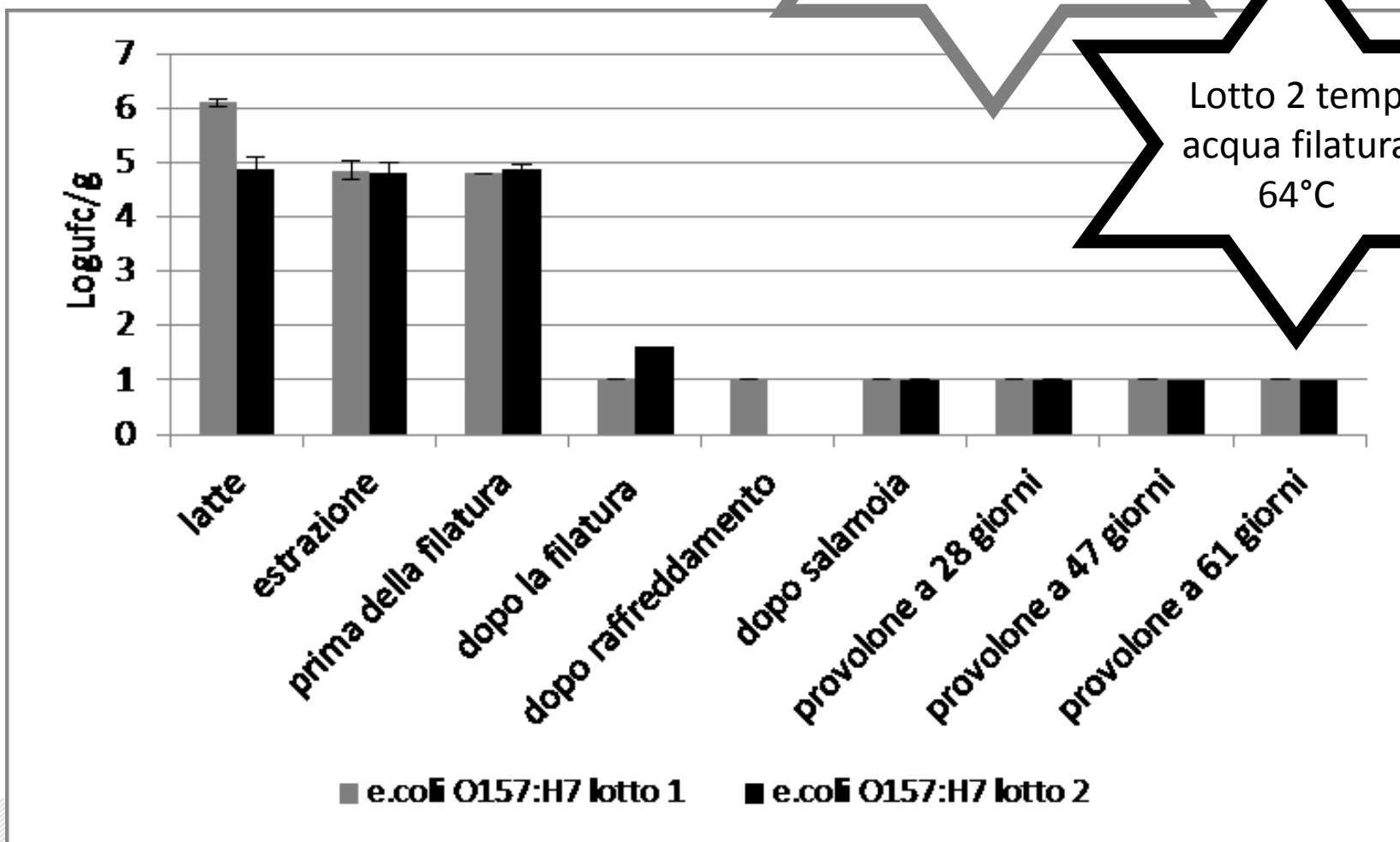


# Dinamica STEC nel formaggio a pasta filata «stagionato»

- Confronto tra lotti *E. coli* VTEC

Lotto 1 temp  
acqua filatura  
68°C

Lotto 2 temp  
acqua filatura  
64°C

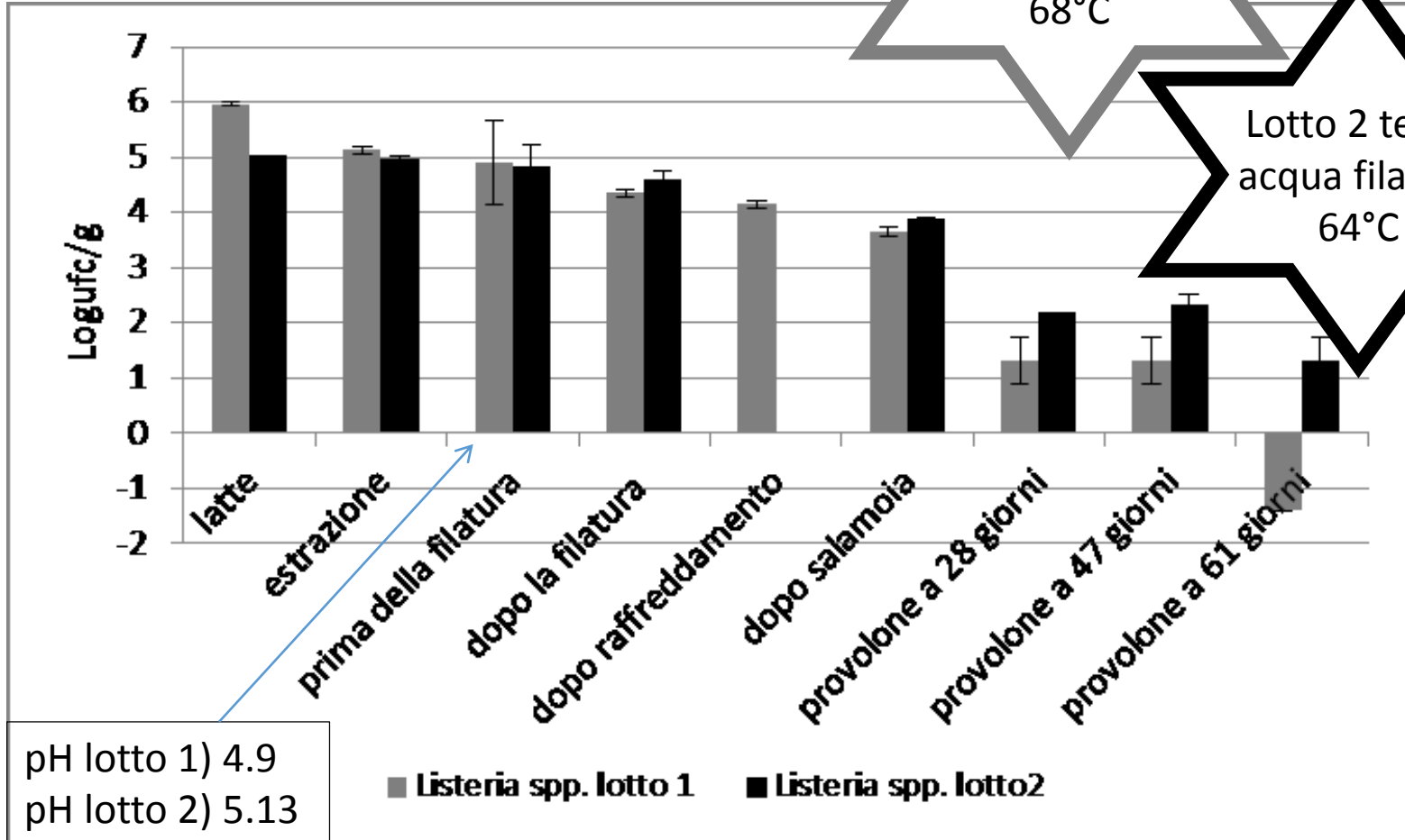




# Dinamica *Lm*-like nel formaggio «a pasta filata stagionato»



- Confronto tra lotti *Listeria spp.*







# Conclusioni



- Il processo di produzione e le caratteristiche intrinseche del prodotto aprono scenari molto diversi nella modulazione dei patogeni nei prodotti a base di latte.
- Pastorizzazione / termizzazione del latte aumentano la sicurezza del prodotto.
- La lavorazione del Grana Padano DOP /Parmigiano Padano DOP (Cottura della cagliata sopra i 52°C ) diminuiscono la concentrazione dei patogeni
- Stagionatura dei formaggi a latte crudo (6 mesi) aumenta la sicurezza dei formaggi a latte crudo nei confronti dell'*E. coli* verocitotossico





# Ringraziamenti



L'Università di Veterinaria di Milano

L'AIVI

I miei responsabili Dr.ssa Losio e Dr.Daminelli

I miei colleghi Elena, Silvia, Paola, Stefania, Daniela,  
Alessandro...

Voi tutti per l'attenzione