



*Listeria monocytogenes*

Laboratorio Nazionale di Riferimento

## Valutazione del comportamento di microrganismi patogeni nel caciocavallo molisano

Giacomo Migliorati, Francesco Pomilio, Luigi Iannetti

I risultati della ricerca corrente condotta dall'IZSAM "G. Caporale". Anno 2014  
Teramo, 9 giugno 2015



# Il progetto

- Ricerca effettuata nell'ambito del progetto finanziato dalla Regione Molise PSR 2007/2013 (bando misura 1.2.4, DDG 660 del 30 luglio 2013) «Milktrack: verifica e documentazione di elementi di tracciabilità reale, funzionalità e sicurezza per la valorizzazione dei prodotti lattiero-caseari in Molise»
- Tra gli obiettivi del progetto, c'è lo **studio delle caratteristiche dei prodotti lattiero-caseari molisani** atte a documentarne la **sicurezza** soprattutto in relazione all'eventuale capacità del prodotto di contrastare in modo attivo la presenza di microrganismi contaminanti



- Challenge test (contaminazioni artificiali) eseguiti presso il Laboratorio Trasformazioni Sperimentali dell'IZSAM, dotato di mini-caseificio
- Impiego della procedura derivata dal Documento Tecnico EURL Lm (Versione 3, giugno 2014) per l'esecuzione di studi di shelf-life su *Listeria monocytogenes* in alimenti RTE



- Il **processo di produzione** del caciocavallo molisano è stato dettagliatamente raccolto in azienda e riprodotto nel Laboratorio Trasformazioni Sperimentali
- La **variabilità inter-lotto** di pH e aw (valutata con metodo EURL Lm) è risultata **non significativa**, pertanto si è proceduto alla contaminazione di un **singolo lotto**
- Nell'ambito del lotto sottoposto ad esperimento, si è proceduto a **3 ripetizioni per tempo di analisi (16 tempi in tutto)**, per ciascun agente patogeno (su caciocavalli contaminati) e per ciascun elemento della flora microbica competitiva (su caciocavalli non contaminati – controlli)
- Per l'elaborazione dei risultati è stato sempre utilizzato il **valore mediano** ottenuto dalle 3 ripetizioni



# Materiali e metodi

## Processo di produzione

- Latte crudo di bovino
- Aggiunta coltura lattica
- Aggiunta caglio di vitello a 37°C
- Coagulazione
- Rottura della cagliata
- Estrazione e riposo della cagliata
- **FILATURA con acqua a 82-90°C**
- Formatura
- Salatura (salamoia)
- **Stagionatura a 12°C e 67% di umidità**
- Nel nostro challenge test la stagionatura è di 67 giorni



# Materiali e metodi



## Inoculo

- Per ciascun agente patogeno è stata utilizzata una coltura contenente una miscela di un ceppo di campo e di un ceppo ATCC
- Prima subcoltura del singolo ceppo su TSB-Ye in condizioni ottimali (37°C) fino al raggiungimento dell'inizio della fase stazionaria
- Seconda subcoltura di adattamento (temperatura, pH e aw del latte al momento della cagliata) fino al raggiungimento dell'inizio della fase stazionaria
- Creazione della miscela delle colture (parti uguali per ciascun ceppo)
- Diluizioni in soluzione fisiologica fino al raggiungimento della concentrazione necessaria a riprodurre una **contaminazione del latte di  $10^5$  UFC/g**
- Inoculo del latte in caldaia prima della cagliata (37°C)



## Microrganismi inoculati:

- *Listeria monocytogenes*
- *E. coli* O157
- *Salmonella* thyphimurium
- Stafilococchi coagulasi positivi

## Flora autoctona valutata sui controlli:

- Lattobacilli
- Lattococchi
- Micrococchi
- Carica batterica mesofila totale
- Enterobatteriacee
- Enterococchi
- Muffe e lieviti

# Materiali e metodi

**Valutati anche pH e aw**



# Materiali e metodi

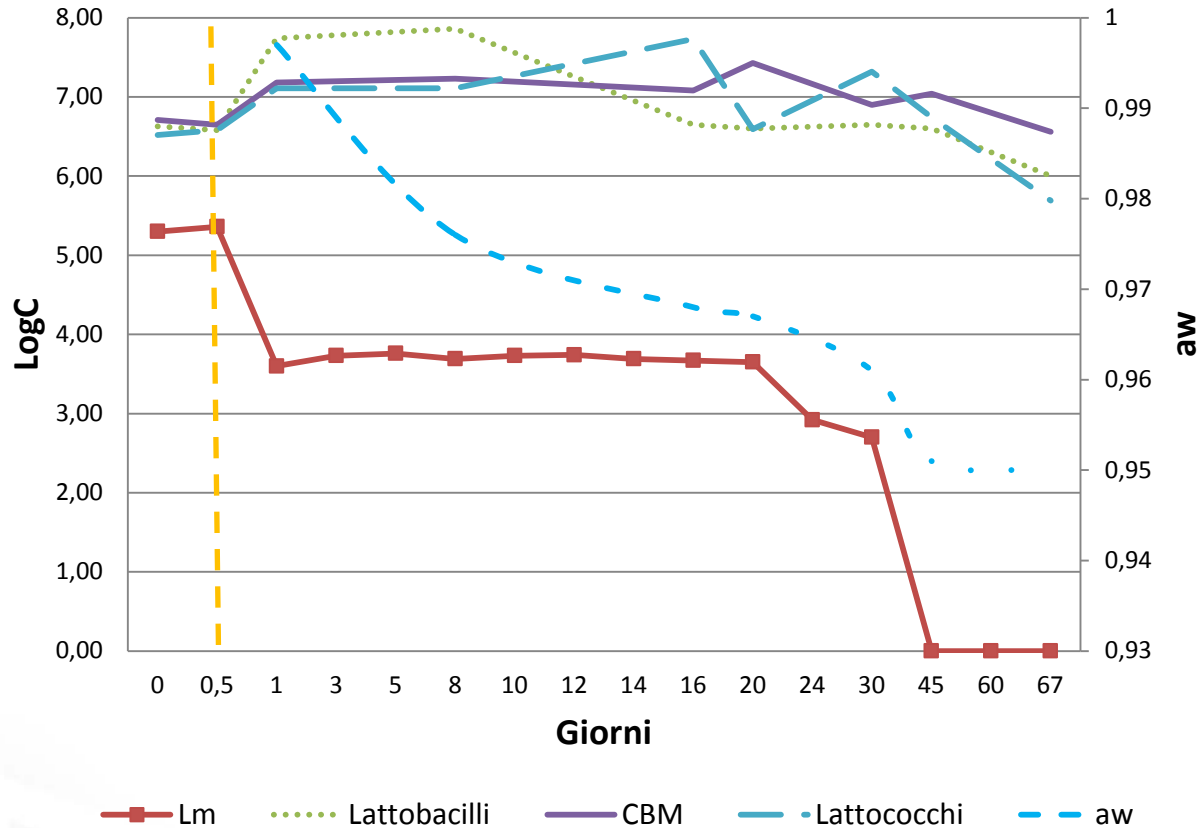
Metodi utilizzati per la numerazione:

- *Listeria monocytogenes*: ISO 11290-2
- Stafilococchi coagulasi-positivi: EN/ISO 6888-2
- *E. coli* O157: metodo interno
- *Salmonella*: metodo interno





## Listeria monocytogenes

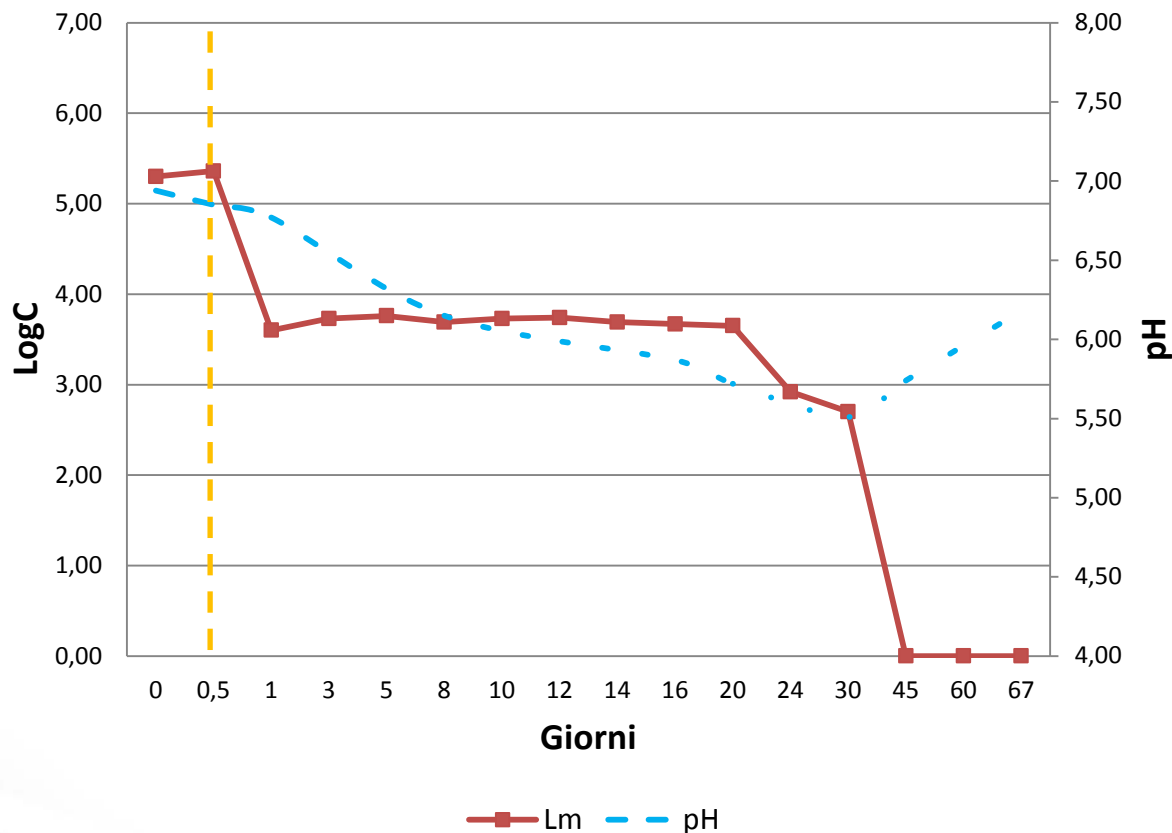


Valore D  
per Lm in  
seguito a  
filatura  
(82-87°C):

2,84 (min)

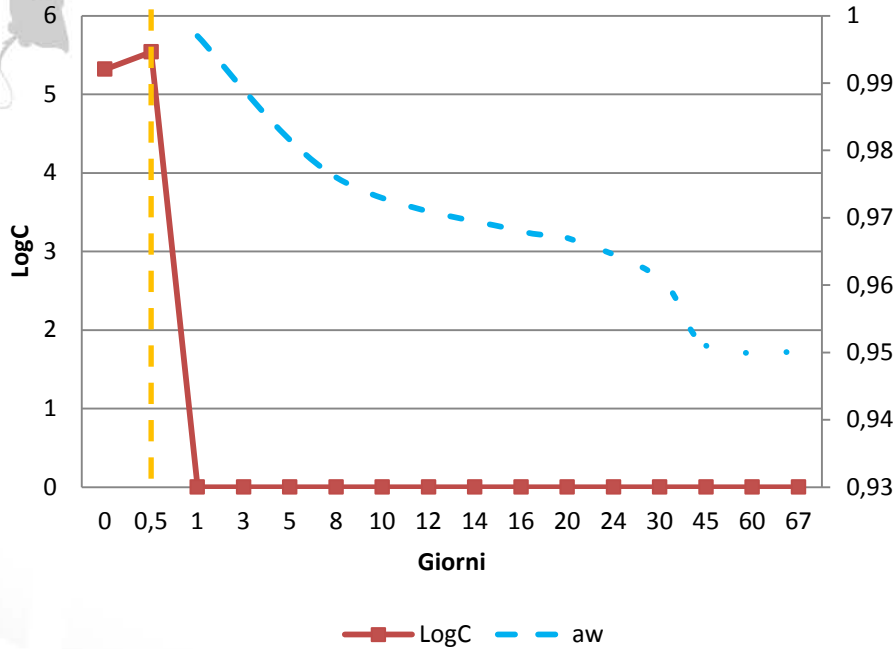
La linea tratteggiata arancione indica la filatura

## Listeria monocytogenes

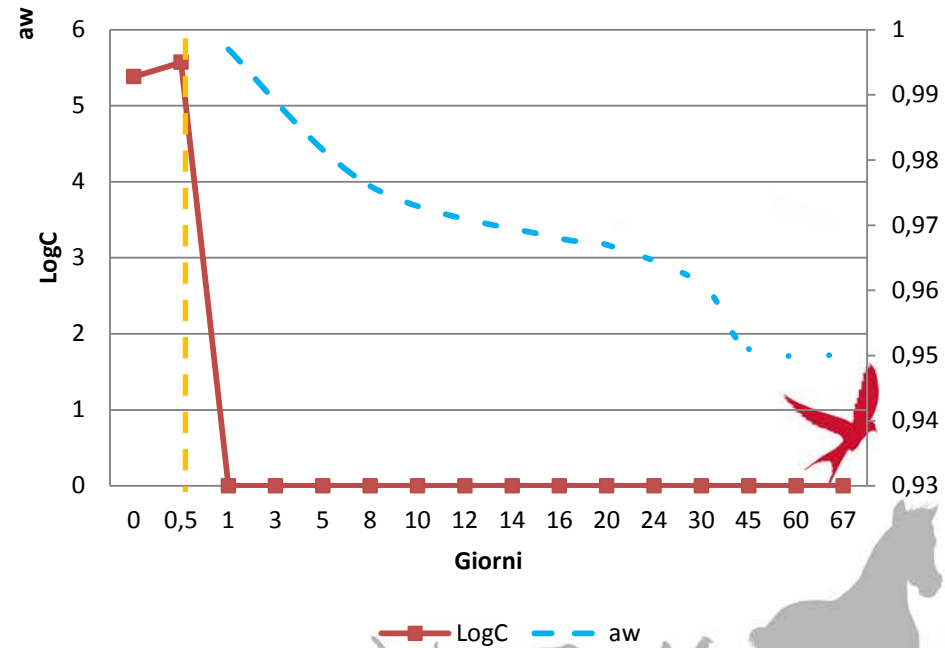


Il pH (sempre  $> 5,0$ ) e l' $a_w$  (sempre  $> 0,94$ ) non hanno effetto rilevante sulla concentrazione di Lm, che è probabilmente influenzata dalla competizione con la flora autoctona

## E. coli O157

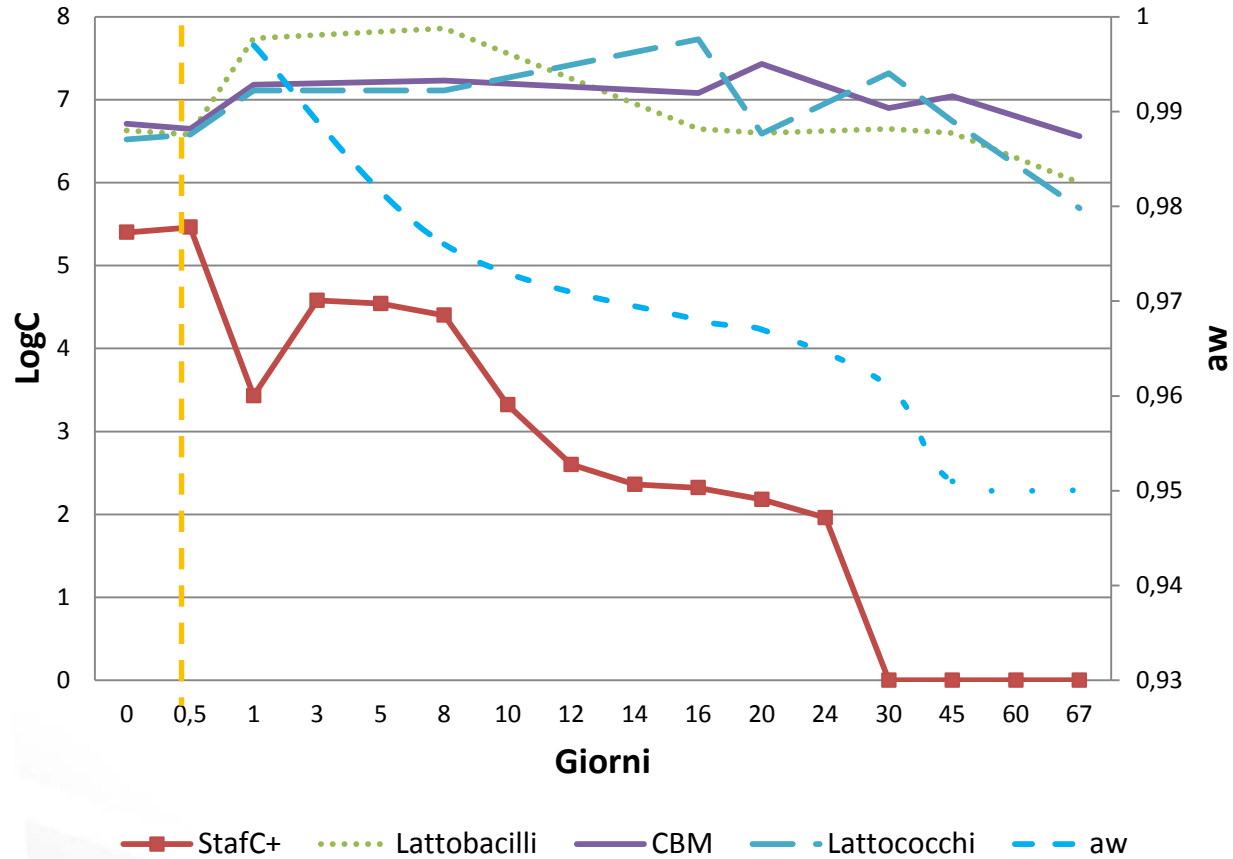


## Salmonella



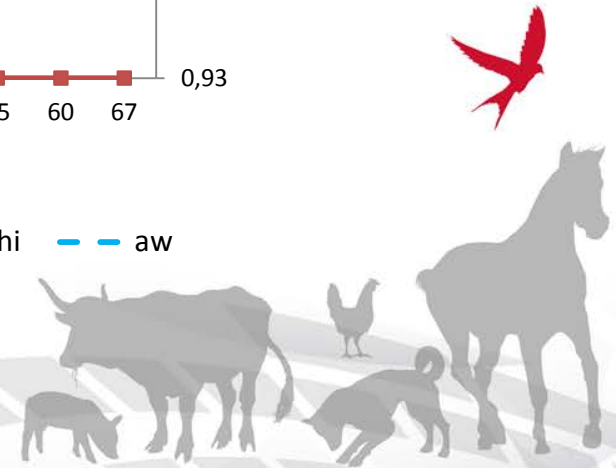
***E. coli* O157 e *Salmonella* non sopravvivono alla filatura**

## Stafilococchi coagulasi positivi



Valore D  
in seguito  
a filatura:

2,46 (min)




# Conclusioni

- Dai challenge test effettuati risulta che nel caciocavallo molisano i principali agenti patogeni sono al di sotto del limite di rilevabilità dopo il 45° giorno di stagionatura, in presenza di alte contaminazioni ( $10^5$  UFC/g) nel latte utilizzato per la cagliata
- *Salmonella* e *E. coli* O157 non sopravvivono alla filatura
- Le contaminazioni da *Listeria monocytogenes* e Stafilococchi coagulasi positivi sono abbattute dal processo di filatura in ragione di valori D (min) pari a 2,84 e 2,46, rispettivamente



# Conclusioni

- 
- In assenza di livelli di pH e aw in grado di determinare inattivazione, la competizione con la flora microbica autoctona è la più probabile causa di decremento e scomparsa di *Listeria monocytogenes* e Stafilococchi coagulasi positivi durante la stagionatura (45 e 30 giorni rispettivamente)
  - I dati ottenuti saranno utilizzati per lo sviluppo di modelli predittivi specifici relativi al comportamento degli agenti patogeni nel caciocavallo molisano





 *Listeria monocytogenes*  
Laboratorio Nazionale di Riferimento

# Ringraziamenti

- I challenge test sono stati effettuati a cura del team del Laboratorio Trasformazioni Sperimentali
- Anna Franca Sperandii
- Gabriella Centorotola
- Diana Neri
- Patrizia Tucci





Grazie per l'attenzione!