Sviluppo di *Listeria monocytogenes* in mozzarella vaccina

Erica Tirloni

Università degli Studi di Milano

Università telematica San Raffele Roma

Giornata di studio Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per Listeria monocytogenes – Teramo, 4 luglio 2019

Stato dell'arte…

- **Mozzarella: 25% vendite dei prodotti lattiero-caseari in Italia.**
- **I RTE come la mozzarella sono di particolare interesse se considerassimo *Listeria monocytogenes***
- **Formaggi freschi, compresa la mozzarella, possono rappresentare un ambiente di crescita adatto per *L. monocytogenes*.**
- **Diverse segnalazioni sono state emesse dal RASFF per la presenza di *L. monocytogenes* in mozzarella nel periodo 2010-2019 (7 casi, *2 in cui le cariche erano 130 e 1800 ufc/g*)**

Stato dell’arte….

Journal of Food Protection, Vol. 55, No. 2, Pages 80-83 (February 1992)
Copyright©, International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians

Fate of *Listeria monocytogenes* During the Manufacture of Mozzarella Cheese

MAHMOUD M. BUAZZI, MARK E. JOHNSON, and ELMER H. MARTH*

Microorganismo (4-5 Log ufc/ml) è inattivato dal processo di filatura

Abilità di crescita post processo

Article

December 9, 1992

A Multistate Outbreak of Salmonella javiana and Salmonella oranienburg Infections due to Consumption of Contaminated Cheese

Craig W. Hedberg, MS; Jack A. Korlath, MPH; J.-Y. D'Aoust, PhD; et al

» Author Affiliations

JAMA. 1992;268(22):3203-3207. doi:10.1001/jama.1992.03490220047026

Obiettivo

- **Caratterizzazione microbiologica e fisico-chimica di diversi brand di mozzarella sul mercato italiano caratterizzati da diversi:**

  - ✓ *latte di origine (latte di vacca o di bufala);*
  - ✓ *metodi di acidificazione e aggiunta di acidi organici (acidificazione diretta mediante aggiunta di acidi organici o acidificazione microbica mediante crescita di colture starter termofile).*

- **Valutazione del potenziale di crescita di *L. monocytogenes* in mozzarella per stabilire l'influenza di fattori microbiologici e chimici (in particolare, la presenza di acidi organici)**

Materiali e metodi – parte 1

33 brand di mozzarella

1-12 mozzarelle vaccine con aggiunta di starter microbici

13-20 mozzarelle vaccine con aggiunta di acidi organici (citrico)

21-27 mozzarelle vaccine per pizza

28-33 mozzarelle bufaline (caglio microbico)

Il peso dei campioni variava da 100 a 250 g, in forme di perle (2-3 g), ciliegie (7-8 g) o pezzi interi (da 100 a 250 g). La durata commerciale dichiarata era compresa tra 25 e 35 giorni a 4 ° C.

Materiali e metodi – parte 1

	Tempi	Parametri
Caratterizzazione microbiologica	**To, T finale (ultimo gg shelf-life)**	**CBT, *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae,* Lieviti, Muffe Lattobacilli, Lattococchi, Streptococchi, *L. monocytogenes* (P/A in 25 g)**
Caratterizzazione chimico-fisica	**T0**	**pH, Aw, Umidità, Acidi Organici lattico, acetico, citrico**

$$Undissociated\ Acid = \frac{[Total\ Acid]}{1+10^{\ pH-pKa}}$$

Acidi organici indissociati

Journal of Food Protection, Vol. 70, No. 11, 2007, Pages 2485–2497
Copyright ©, International Association for Food Protection

Modeling and Predicting the Growth of Lactic Acid Bacteria in Lightly Preserved Seafood and Their Inhibiting Effect on *Listeria monocytogenes*

OLE MEJLHOLM* AND PAW DALGAARD

Danish Institute for Fisheries Research, Department of Seafood Research, Technical University of Denmark, Søltofts Plads, Building 221, DK-2800, Kongens Lyngby, Denmark

MS 07-167: Received 28 March 2007/Accepted 22 June 2007

International Journal of Food Microbiology 167 (2013) 244–260

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Development and validation of an extensive growth and growth boundary model for psychrotolerant *Lactobacillus* spp. in seafood and meat products

Ole Mejlholm *, Paw Dalgaard

National Food Institute (DTU Food), Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, Denmark

International Journal of Food Microbiology 290 (2019) 150–158

Contents lists available at ScienceDirect

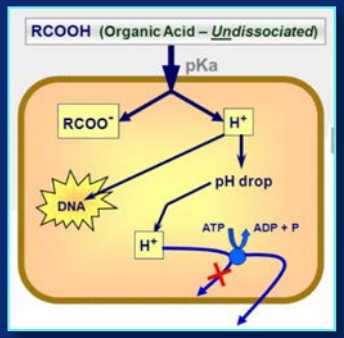
International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

New insights on *Listeria monocytogenes* growth in pressurised cooked ham: A piezo-stimulation effect enhanced by organic acids during storage

Sara Bover-Cid[a,*,1], Cristina Serra-Castelló[a,1], Paw Dalgaard[b], Margarita Garriga[a], Anna Jofré[a]

[a] IRTA, Food Safety Programme, Finca Camps i Armet, E-17121 Monells, Girona, Spain
[b] National Food Institute (DTU Food), Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, Denmark



L'effetto degli acidi organici e dei loro sali è stato ampiamente studiato e diversi strumenti predittivi possono essere utilizzati per progettare prodotti che non supportano la crescita del patogeno.

Le forme indissociate di alcuni acidi deboli diffondono liberamente attraverso la membrana cellulare e si ionizzano nella cellula dando protoni che l'acidificano.

Su questa ipotesi si basa l'effetto degli acidi non dissociati come conservanti, effetto noto da decenni.

Materiali e metodi – parte 2

- **Potenziale di crescita**: 1 brand prodotto attraverso acidificazione diretta. **Peggior scenario dal punto di vista chimico-fisico** (pH e acidi organici): maggiore probabilità di favorire la crescita di *L. monocytogenes*

- *7 challenge test (tra 4 e 20°C), triplicato (21 curve di crescita totali), da 8 a 17 sessioni di campionamento*

- *Mixture di 3 ceppi di L. monocytogenes (1 ATCC, 1 da outbreak, 1 da prodotto lattiero-caseario)*
  - ✓ *analisi microbiologiche (L.M + microflora)*
  - ✓ *analisi chimico-fisiche (pH, acidi organici)*

~3 Log UFC/mL

Risultati- parte 1

Table 1. Physicochemical results obtained for 33 brands of mozzarella cheese[1]

Brand	pH	Moisture content (%)	Lactic acid (water phase) Mean (mg/kg)	Lactic acid (water phase) SD	Citric acid (water phase) Mean (mg/kg)	Citric acid (water phase) SD	Acetic acid (water phase) Mean (mg/kg)	Acetic acid (water phase) SD
Cow milk with starter cultures								
1	5.86	67.13	2,289	324	6,835	1,234	169	12
2	6.12	70.65	1,183	29	4,236	223	161	117
3	5.74	68.78	2,527	72	6,992	65	213	79
4	5.78	61.90	4,073	204	9,843	41	343	154
5	6.04	64.81	2,059	0	<LOD	—	238	337
6	5.83	66.52	2,553	0	<LOD	—	559	0
7	6.00	60.21	1,821	3	6,283	42	177	11
8	5.95	60.02	2,499	7	5,561	253	206	6
9	5.68	65.68	2,954	0	3,347	4,733	266	375
10	5.69	59.46	4,087	144	10,060	429	297	14
11	5.77	59.86	4,349	50	14,261	715	365	16
12	6.23	61.65	1,875	11	20,815	141	<LOQ[2]	31
Cow milk with citric acid								
13	6.13	65.88	311	19	13,318	451	421	85
14	5.49	63.81	<LOD	—	1,409	—	<LOD	—
15	6.38	63.18	<LOD	—	1,287	—	914	—
16	6.13	67.41	1,230	56	9,734	525	267	7
17	5.77	62.15	4,255	368	10,976	265	317	92
18	6.41	63.83	<LOD	—	9,024	275	0	—
19	5.43	67.17	122	68	11,333	67	459	5
20	6.43	62.70	175	11	7,803	797	364	30
Cow milk for pizza								
21	5.69	53.55	10,955	484	20,502	627	782	33
22	6.23	49.34	14,709	304	29,195	351	1,725	37
23	6.05	49.96	14,677	1,236	28,435	1,254	1,105	98
24	5.72	55.31	650	79	26,120	1,003	717	25
25	6.48	61.07	814	12	21,752	381	543	11
26	5.32	48.47	14,312	749	25,223	1,207	1,583	114
27	5.56	63.84	2,970	18	32,606	221	239	49
Buffalo milk with microbial rennet								
28	5.32	65.30	4,755	512	12,321	1,412	<LOD	—
29	5.47	65.00	4,774	80	10,800	422	<LOD	—
30	5.33	62.37	4,301	0	5,226	7,390	<LOD	—
31	5.56	65.77	1,756	3	21,173	524	<LOD	—
32	5.42	62.15	5,782	40	1,930	237	647	13
33	5.37	61.65	4,647	39	8,339	306	<LOD	—

[1]LOQ = limit of quantification (722 mg/kg for citric acid, 52 mg/kg for lactic acid, and 157 mg/kg for acetic acid). LOD = limit of detection (216 mg/kg for citric acid, 16 mg/kg for lactic acid, and 47 mg/kg for acetic acid).
[2]LOQ = 152.

5.74-6.23

5.43-6.43

3/8 <52%

5.72-6.23

5.32-5.56

>52%

<LOD-20,815 ppm

1,287-13,318 ppm

20,502-32,606 ppm

1,930-21,173 ppm

Risultati- parte 1

Wemmenhove et al. (2016) calcolate in brodo in range di pH che includevano condizioni rilevanti per formaggi stile Dutch (5.2–5.6) a 30°C

Tirloni et al. (2019) calcolate in ricotta a 14°C

Table 3. Undissociated (UN) organic acid concentrations calculated in mozzarella cheese samples

Item	UN lactic acid (m*M*)	UN citric acid (m*M*)	UN acetic acid (m*M*)
MIC			
Wemmenhove et al. (2016)	5.0 ± 0.5	19.0 ± 6.5	3.8 ± 0.9
Tirloni et al. (2019)	5.1–14.7	>24	>8.8
Cheese sample			
1	0.25	0.06	0.21
2	0.07	0.02	0.11
3	0.36	0.08	0.34
4	0.54	0.11	0.50
5	0.15	0.00	0.20
6	0.30	0.00	0.73
7	0.15	0.04	0.16
8	0.22	0.04	0.21
9	0.49	0.05	0.47
10	0.66	0.13	0.52
11	0.59	0.16	0.54
12	0.09	0.08	0.08
13	0.02	0.06	0.29
14	0.00	0.03	0.00
15	0.00	0.00	0.36
16	0.07	0.05	0.18
17	0.57	0.12	0.47
18	0.00	0.02	0.00
19	0.04	0.27	1.35
20	0.01	0.02	0.13
21	1.48	0.23	1.16
22	1.48	0.24	1.94
23	2.37	0.38	1.94
24	0.03	0.10	0.39
25	0.06	0.13	0.44
26	2.16	0.31	2.60
27	0.08	0.07	0.07
28	1.77	0.38	0.00
29	1.27	0.24	0.00
30	1.56	0.16	0.00
31	0.38	0.38	0.00
32	1.72	0.05	1.93
33	1.55	0.23	0.00

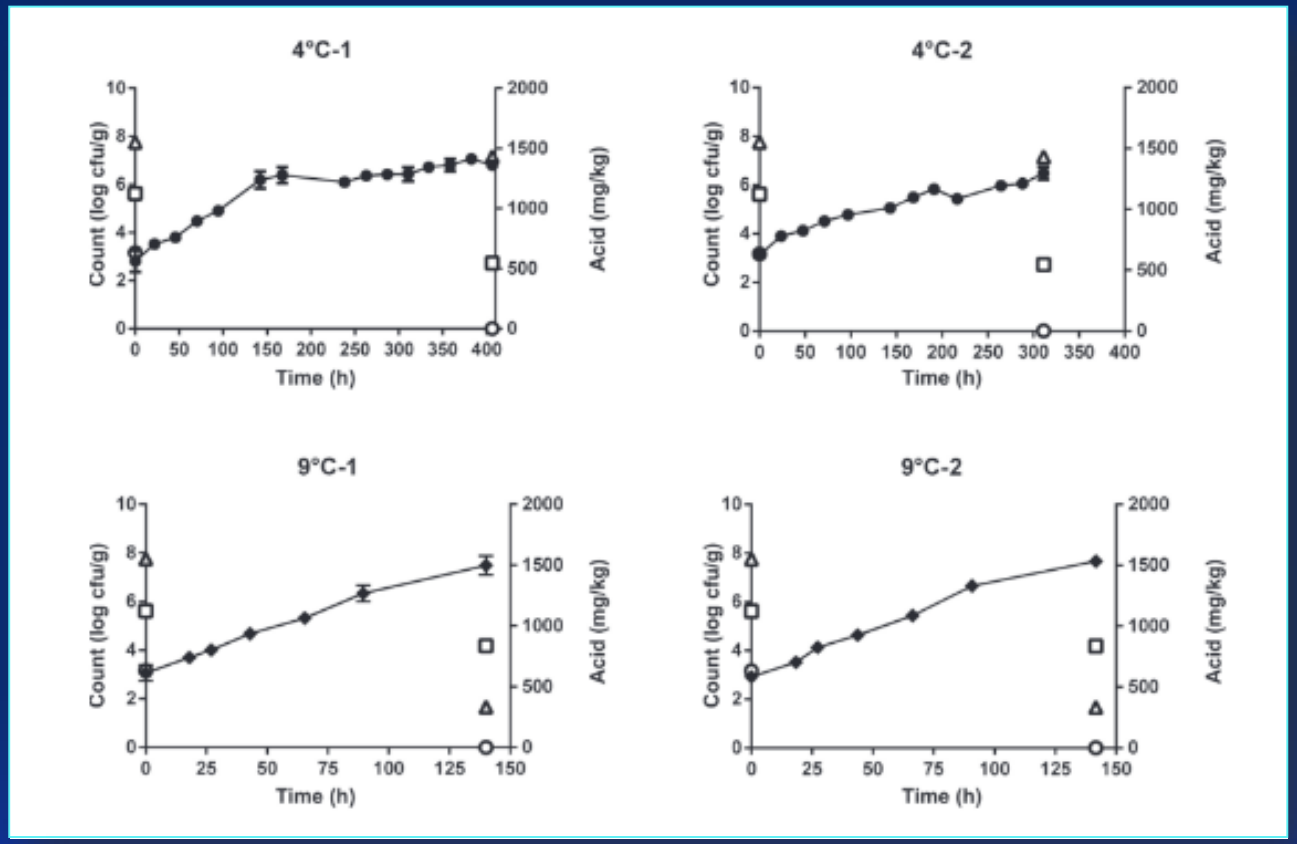
Risultati- parte 1

Table 2. Main microflora (expressed in parentheses as log cfu/g) present at the beginning (T0) and end (T final; assigned by producer) of the declared shelf life in 33 brands of mozzarella cheese

Brand	T0	T final
Cow milk with starter cultures		
1	Streptococci (>5), *Pseudomonas* spp. (>5)	*Pseudomonas* spp. (>8)
2	Streptococci (>5)	*Pseudomonas* spp. (>8)
3	Streptococci (>8)	Streptococci (>8)
4	Streptococci (>7)	Streptococci (>7)
5	Lactobacilli (>7)	Streptococci (>8), lactobacilli (>8)
6	Streptococci (>7), lactobacilli (>7)	Streptococci (>8), lactobacilli (>8)
7	Streptococci (>5)	Streptococci (>8), lactobacilli (>8), *Pseudomonas* spp. (>8)
8	Streptococci (>8), lactobacilli (>7), *Pseudomonas* spp. (>5)	Streptococci (>8), lactobacilli (>8), *Pseudomonas* spp. (>8)
9	Streptococci (>8), lactobacilli (>7), *Pseudomonas* spp. (>5)	Streptococci (>8), lactobacilli (>8), *Pseudomonas* spp. (>7)
10	Streptococci (>6), *Pseudomonas* spp. (>5)	Streptococci (>7), lactobacilli (>7)
11	Streptococci (>7)	Streptococci (>7)
12	Streptococci (>7), lactobacilli (>7), *Pseudomonas* spp. (>7)	Streptococci (>8), lactobacilli (>7), *Pseudomonas* spp. (>7)
Cow milk with citric acid		
13	Lactobacilli (>5)	Streptococci (>7), lactobacilli (>6)
14	Lactobacilli (>5)	Lactobacilli (>6)
15	Streptococci (>7), *Pseudomonas* spp. (>7)	Streptococci (>7), *Pseudomonas* spp. (>7)
16	Streptococci (>5)	Streptococci (>5), lactobacilli (>5), *Pseudomonas* spp. (>6)
17	Streptococci (>5), *Pseudomonas* spp. (>5)	Streptococci (>5), lactobacilli (>5)
18	—	Streptococci (>6)
19	Lactobacilli (>5)	Lactobacilli (>6)
20	—	Streptococci (>5), lactobacilli (>6)
Cow milk for pizza		
21	Streptococci (>5)	Streptococci (>8)
22	Streptococci (>7), lactobacilli (>5)	Streptococci (>8), lactobacilli (>6)
23	Streptococci (>7)	Streptococci (>8)
24	Lactobacilli (>5)	Lactobacilli (>6)
25	Lactococci (>5)	Streptococci (>6), lactobacilli (>7), *Pseudomonas* spp. (>7), lactococci (>6)
26	Streptococci (>5), lactobacilli (>5)	Streptococci (>6), lactobacilli (>7)
27	Streptococci (>5), lactobacilli (>5), *Pseudomonas* spp. (>5), lactococci (>5)	Streptococci (>6), lactobacilli (>6), *Pseudomonas* spp. (>6), lactococci (>6)
Buffalo milk with microbial rennet		
28	Yeasts (>5)	Yeasts (>7), lactobacilli (>6)
29	Yeasts (>5), lactobacilli (>5), lactococci (>5)	Yeasts (>7), lactobacilli (>6), lactococci (>6), streptococci (>6)
30	Yeasts (>5), lactobacilli (>5), lactococci (>5), streptococci (>5)	Yeasts (>7), lactobacilli (>6), lactococci (>6), streptococci (>6)
31	—	Yeasts (>5), lactobacilli (>7), streptococci (>5)
32	Yeasts (>5), lactobacilli (>7), lactococci (>6), streptococci (>6)	Yeasts (>6), lactobacilli (>8), lactococci (>7), streptococci (>7)
33	Yeasts (>5), lactobacilli (>5), lactococci (>5)	Yeasts (>6), lactobacilli (>6), lactococci (>6)

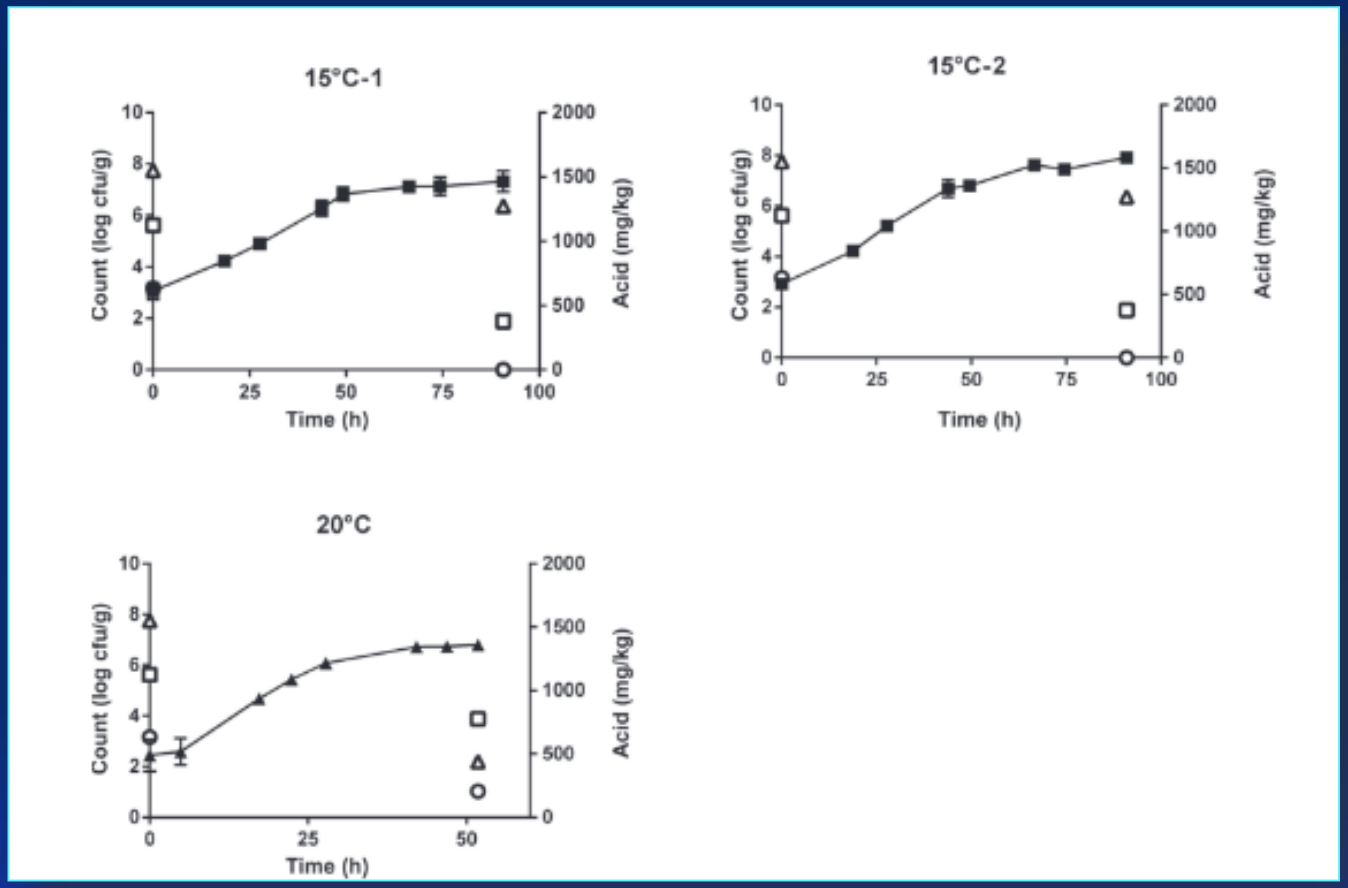
- ✓ **A T0 la microflora naturale (LAB o spoilage come Pseudomonas,) era già presente.**
- ✓ **Mozzarella di bufala: spoilage → lieviti**
- ✓ ***Enterobacteriaceae* erano sempre inferiori al limite di rilevabilità (2 log ufc/g).**
- ✓ ***L. monocytogenes* non è mai stato rilevata in nessuno dei campioni analizzati a T0 o T finale.**

Risultati- parte 2



- ✓ 4°C, incrementi tra 3.36 e 3.99 log ufc/g dopo 13 e 17 gg,
- ✓ 9°C incrementi tra 4.43 e 4.75 log ufc/g in meno di 6 gg

Risultati- parte 2



- ✓ 15°C incrementi tra 4.26 e 4.99 log ufc/g in meno di 4 gg
- ✓ 20°C incremento di 4.35 log ufc/g in 2 gg

Risultati- parte 2

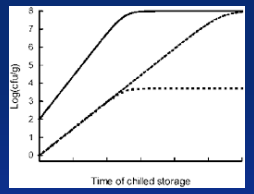
- **La popolazione batterica principale comprendeva streptococchi e lattobacilli a T0 (da 3,3 a 3,45 log ufc/g)**

- **Questa microflora ha mostrato una crescita evidente durante tutti i challenge test alle diverse temperature, raggiungendo valori superiori a 7 log ufc /g.**

↓

Nessuna attività antagonistica importante della microflora naturale:

per esercitare un'efficace attività antagonista la microflora naturale dovrebbe raggiungere rapidamente cariche elevate: qui non è successo



Jameson effect, 1962

pH permissivo (T0 da 6.42 a 6.60, T finale da 6.25 a 6.48)

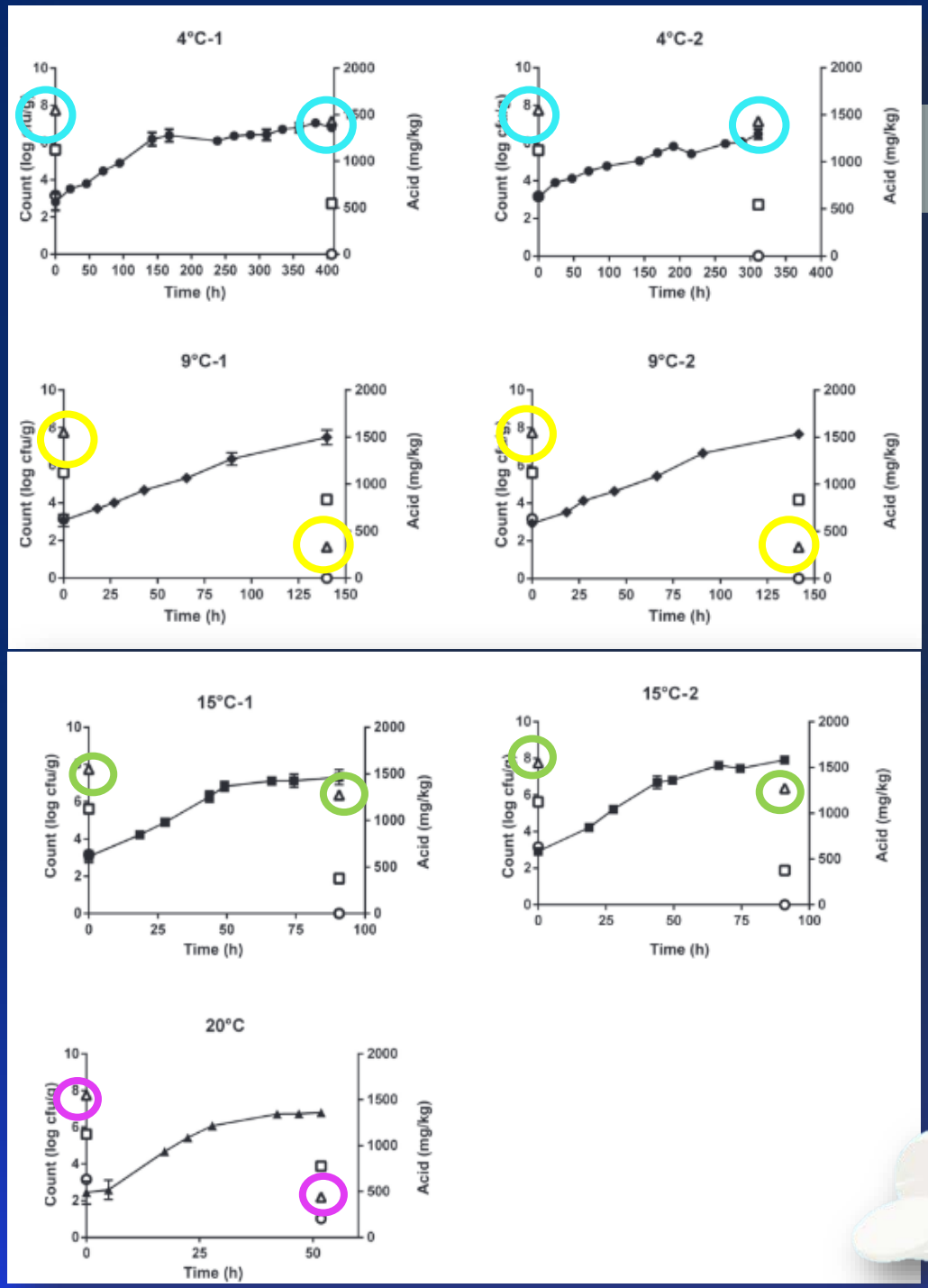
Acidi organici

La concentrazione di acido citrico era 45,5% del totale (aggiunto a scopo tecnologico)

diminuzione durante il periodo considerato

Questi risultati erano in accordo con quelli riportati da Lombardi et al. (1994) per il formaggio Reggiano.

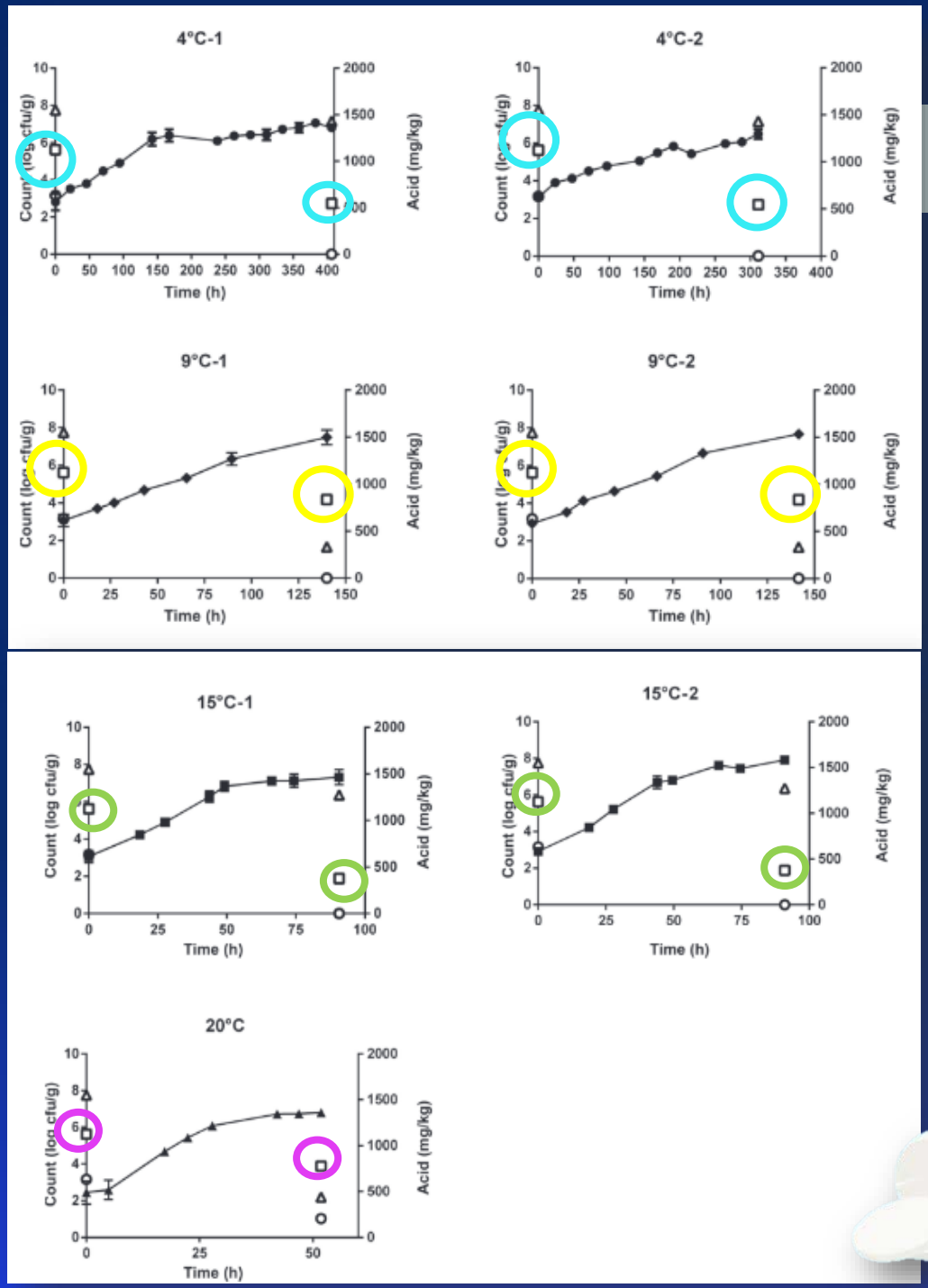
Questa diminuzione potrebbe essere dovuta al metabolismo della microflora naturale



Acidi organici

La concentrazione di **acido acetico** era 35,9% del totale

Durante il periodo di conservazione, una costante diminuzione è stata osservata nei campioni a tutte le temperature considerate.



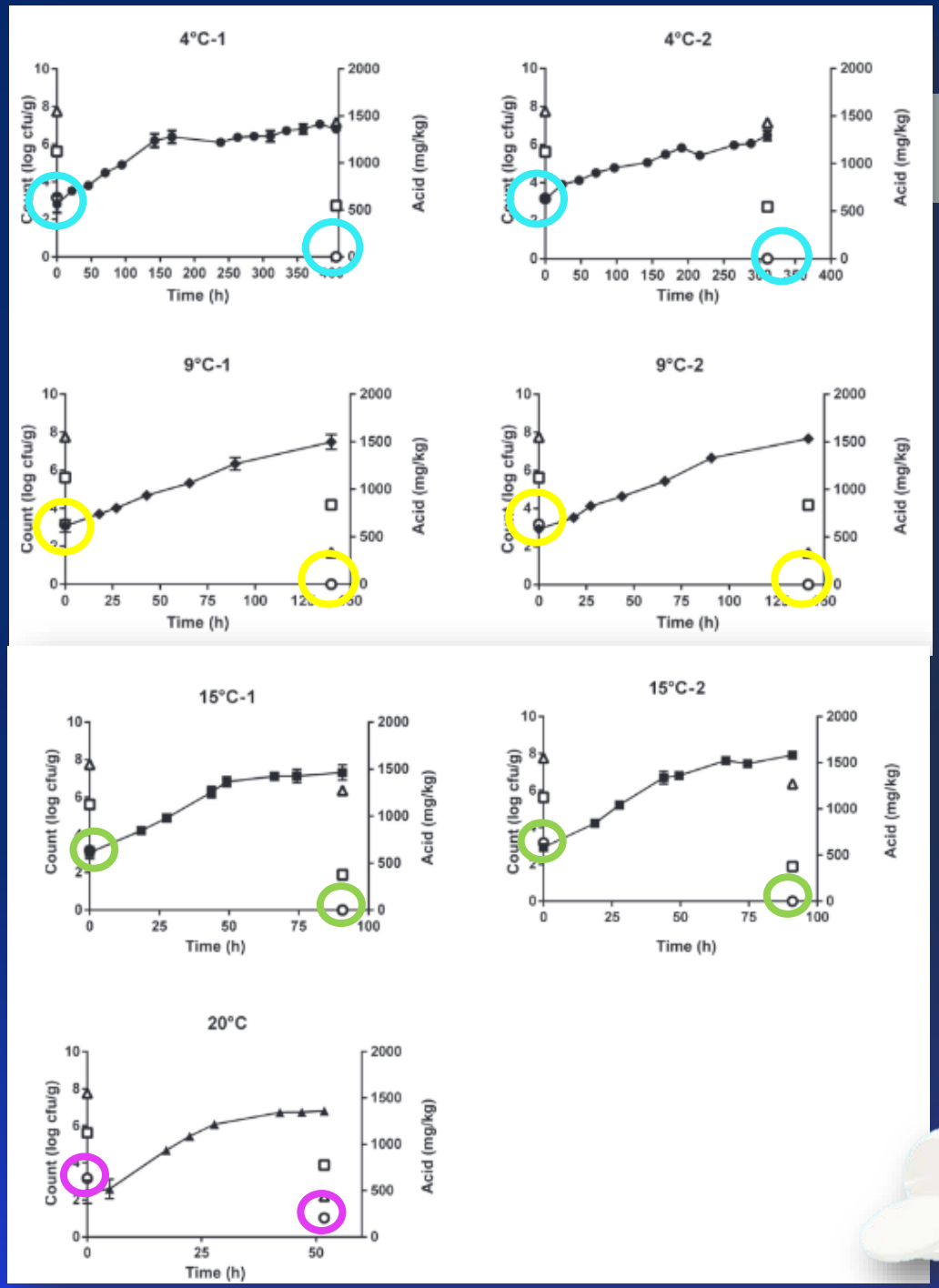
Acidi organici

La concentrazione di **acido lattico** inizialmente (T0) rappresentava circa il 18,6% del contenuto totale

Diminuzione nel tempo (<LOD)

Risultati in disaccordo con *Califano e Bevilacqua (1999)*, che riferivano che questo acido rappresentava circa il 79,3% del contenuto totale dopo il 3 gg in mozzarelle.

La differenza potrebbe essere spiegata dalle diverse mozzarelle analizzate (nello studio: mozzarella a bassa umidità, noi ad alta umidità)



Risultati- parte 2

Table 4. Initial cell concentration, lag time, maximum specific growth rate, and maximum population density determined by fitting a primary model to growth kinetics obtained from challenge tests at different temperatures[1]

	4°C		9°C		15°C		20°C
Item	*a*[2]	*b*[2]	*a*	*b*	*a*	*b*	*a*
Initial cell concentration (log cfu/g)	2.81	3.12	3.06	2.92	3.06	2.92	2.45
Lag time (h)	—	—	—	2.4	3.4	6.5	4.4
Maximum specific growth rate (h^{-1})	0.060	0.053	0.084	0.096	0.21	0.21	0.39
Maximum population density (log cfu/g)	6.80	6.48	7.49	7.67	7.32	7.91	NA

[1]Dash indicates not present; NA = not applicable for the short storage time.

[2]*a*, *b* = duplicate samples.

Conclusioni

- **Eterogeneità delle caratteristiche chimico-fisiche di 33 brand di mozzarella**
- **Acidi organici < MIC presenti in letteratura perciò permissivi per crescita di *L. monocytogenes***
- **Importanza acidi organici per riformulazione mozzarella**
- **Contaminazione post processo: rapida crescita non inibita neppure dalla presenza di microflora lattica e alterante abbondante**
- **Attenzione alla corretta manipolazione post apertura e al corretto mantenimento delle T di stoccaggio**

GRAZIE!

Simone Stella

Cristian Bernardi

Per Sand Rosshaug

J. Dairy Sci. 102:4913–4924
https://doi.org/10.3168/jds.2018-15991
© American Dairy Science Association®, 2019.

Potential growth of *Listeria monocytogenes* in Italian mozzarella cheese as affected by microbiological and chemical-physical environment

E. Tirloni,[1]* C. Bernardi,[1] P. S. Rosshaug,[2] and S. Stella[1]
[1]Department of Health, Animal Science and Food Safety, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 10, IT-20133, Milan, Italy
[2]HOFOR, Ørestads Boulevard 35, 2300 Copenhagen S, Denmark