



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Corso  
AGGIORNAMENTI SULLE ATTIVITA' DI  
RICERCA DEL C.RE.L.D.O.C. E DEL  
C.RE.N.M.O.C.

Fosfatasi Alcalina nei formaggi ovini e caprini



*Simonetta Amatiste*

*13 dicembre 2022*



## AGENDA

RASFF

ESEMPI DALLA BIBLIOGRAFIA

FOSFATASI ALCALINA (ALP)

Bull IDF 2019

Bull IDF 2022

Legislazione: Norme CE

Metodi analitici qualitativi e quantitativi

Norme ISO

RISULTATI SPERIMENTALI

EFSA journal 2021

Conclusioni





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## RASFF window results 1-1-'22 -/6-12-'22



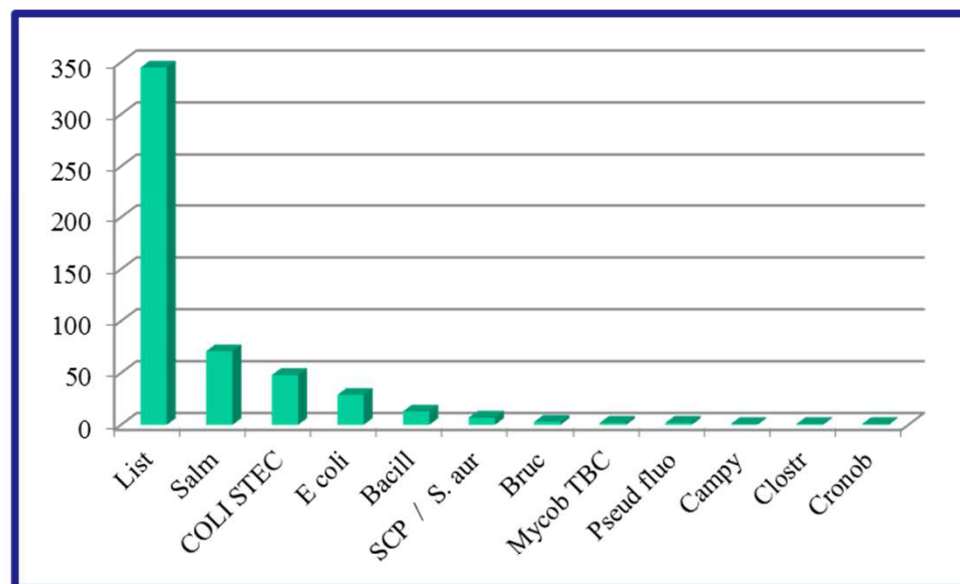
subject	notifying_country	risk_decision	distribution	origin
Listeria monocytogenes in cheese feta dop	Italy	serious		Greece
STEC in raw milk cheese from the Netherlands	Germany	serious	Germany	Netherlands
Farmer's Cheese Old	Netherlands	not serious	Bonaire, Sint Eustatius and Saba	Netherlands
presence of E.Coli in cheese with raw milk	France	not serious	Belgium, Luxembourg	France
Salmonella in cheese from France	Netherlands	serious	Netherlands, Belgium, Germany	France
Listeria in burrata di bufala con panna from Italy	Italy	serious	Austria, Italy	Italy
raclette cheese Listeria monocytogenes	France	serious	Morocco, Kenya, Italy, United Arab Emirates, Andorra, Georgia	France
Listeria monocytogenes in cheese from Poland	Poland	serious	Slovakia	Poland
Listeria monocytogenes in Gouda cheese from Germany	Austria	serious	Austria	Germany
Listeria monocytogenes in cheese from Germany	Germany	serious	Denmark, Austria, Germany	Germany
Listeria monocytogenes in vegan cheese substitute from France	Germany	serious	Spain, Netherlands, Austria, Belgium, Ireland, Italy, Germany	France
Listeria monocytogenes in cream cheese from Spain	Germany	serious	France, Germany	Spain
Listeria monocytogenes in cheese from the Czech Republic	Czech Republic	serious		Czech Republic
Listeria in goat raw milk cheese	France	serious	Netherlands, France, Belgium, Germany, Luxembourg	France
Detection of listeria in TALEGGIO cheese made in Italy	France	serious	France, Italy	Italy
Salmonella detected in grated cheese mix	Netherlands	serious	Netherlands, United Kingdom	Spain
Listeria monocytogenes in vegan organic cheese alternative from France	Germany	serious	Spain, Netherlands, Belgium, Italy, Germany	France
Listeria monocytogenes in goat cheese balls with fig heart 90g	France	serious	France, Belgium	France
Listeria monocytogenes in chilled raw milk cheese from France	France	serious	France, United Kingdom, Italy, Germany	France
shigatoxine-producing Escherichia coli in sheep's cheese from Greece	Belgium	serious	Belgium, Luxembourg	Greece
Listeria monocytogenes in sheep's cheese from Spain	Spain	serious	Spain, France, Canada	Spain
Listeria monocytogenes in raw milk goat cheese from France	Belgium	serious	United Kingdom, Belgium, Switzerland, Italy, United Arab Emirates, Germany	France
shigatoxine-producing Escherichia coli in raw milk cheese from France	Belgium	serious	Belgium, Luxembourg	France
Verotoxin-producing E.coli in soft cheese from France	Germany	serious	Slovenia, Austria, Belgium, Italy, Germany	France
VTEC/STEC in raw milk cheese from France	Germany	serious	Germany	France
Listeria monocytogenes in raw milk cheese from Belgium	France	serious	France	Belgium
Listeria monocytogenes in cheese from Spain via The Netherlands	Belgium	serious	Netherlands, Belgium, Luxembourg	Spain
shigatoxin-producing Escherichia coli in raw milk cheese from Italy	Italy	serious	United Kingdom, Italy	Italy



## RASFF Portal

Search criteria

| Product category milk and milk products |  
Hazard category pathogenic micro-organism





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Riferenza Nazionale  
per la Qualità del Latte e dei Prodotti Derivati  
degli Ovini e dei Caprini

2012 /sett 2017 - prodotti al latte crudo						
	GOAT	paese prod	SHEEP	paese prod	COW	paese prod
Listeria	4	F	10	(9F 1S)	9	F
Salm	2	F	3	F	3	F
COLI STEC	5	F	2	F	8	(5F 1B 1IRL 1G)
E. coli			1	F		
Bruc					1	F
totale	11		16		21	

2012 sett 2017	Alert su Prodotti ITALIANI	
Listeria	33	24 gorgonzola
Salm	1	mozzarella di bufala
E. coli	2	mozz buf e burrata
Bacill	1	ricotta





Costard S, Espejo L, Groenendaal H, Zagmutt FJ.  
**Outbreak-Related Disease Burden Associated with Consumption of  
Unpasteurized Cow's Milk and Cheese**, United States, 2009–2014. *Emerg Infect  
Dis.* 2017;23(6):957-964. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2306.151603>



Raw milk and cheese cause 840 times more illnesses than pasteurized products  
BY [HELEN BRANSWELL](#) @HELENBRANSWELL  
MAY 9, 2017





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



## Food Standards Australia New Zealand

### MICROBIOLOGICAL RISK ASSESSMENT OF RAW MILK CHEESES (2009)

#### Raw goat milk

...international data indicate raw goat milk may contain *Aeromonas* spp., *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., pathogenic *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Mycobacterium* spp., *S. aureus* and *Yersinia enterocolitica*. In Australian surveys, potential pathogens detected in raw goat milk have included *E. coli*, *L. monocytogenes*, and *Y. enterocolitica*. [...]

*Campylobacter* spp. have been isolated from raw goat milk with very low prevalence (0.04%) in the UK ... Western Australia has been the only state to detect *Campylobacter* spp. (during the period 2003 – 2006) in raw goat milk with 6 out of 113 samples (5.3%) testing positive.

The prevalence of *E. coli* (both generic and pathogenic) in raw goat milk has been cited as ranging between 0 - 16.3 % internationally...

**An Italian study also reported the prevalence of *E. coli* O157:H7 at 1.7%.**



*L. monocytogenes* was detected at levels up to 2.56% (Spain)...*Salmonella* spp., it is rarely detected...Prevalence of *S. aureus* contamination varies greatly with between 0 - 96.2% of international samples tested being found positive...**Coagulase positive *Staphylococcus* spp. have been detected in goat milk in all States of Australia except Queensland, with an overall contamination rate of 20.32%.**

### Raw sheep milk

There is little data available on the prevalence of pathogens in raw sheep milk. International data suggests that prevalence of *S. aureus*, *Brucella* spp. and *E. coli* (EHEC) ranges from 7 – 33.3%, 14.2 - 46%, and 1 – 12.7% respectively. Surveys for *C. jejuni* and *Salmonella* failed to detect these organisms in sheep milk...





**trattamento termico:**

**latte crudo** ( $<40^{\circ}\text{C}$ ),

**latte termizzato** (sotto la pastorizzazione; ad esempio,  $57-65^{\circ}\text{C}$  per 15 s),

**latte pastorizzato HTST** ( $72^{\circ}\text{C}$ , 15-20 s),

**latte altamente pastorizzato** ( $85^{\circ}\text{C}$ ,  $>5$  s),

**latte ESL** (microfiltrazione o bactofugazione seguita da pastorizzazione;

riscaldato direttamente: tipicamente  $127^{\circ}\text{C}$  per 3 s;

riscaldato indirettamente: tipicamente  $123-125^{\circ}\text{C}$  per 2 s),

**latte UHT** ( $135^{\circ}\text{C}$  per 1 s),

**latte sterilizzato** ( $121^{\circ}\text{C}$  per  $>3$  min sotto pressione in un'autoclave),

**latte evaporato/condensato** (preriscaldamento del latte a  $110-120^{\circ}\text{C}$  per 1-3 min, rimozione parziale dell'acqua mediante bollitura sotto vuoto a  $70^{\circ}\text{C}$ , seguito da trattamento UHT o sterilizzazione in caso di latte evaporato latte evaporato).

Fonte: sinossi della ricerca [Van den Oever, S. P., & Mayer, H. K. \(2021\). Analytical assessment of the intensity of heat treatment of milk and dairy products. International Dairy Journal, 105097.](#)

Di Redazione Ruminantia | 27 Dicembre 2021



## FOSFATASI ALCALINA (Alkaline phosphatase - ALP)

- La fosfatasi alcalina è un enzima presente nei tessuti dei mammiferi e nel latte crudo
- è una fosfomonoesterasi che idrolizza gli esteri fosforici in ambiente basico (max della attività a pH 9,4)
- La defosforilazione della caseina avviene a pH 7
- È una metallo glicoproteina che ha bisogno dello Zinco e del Magnesio per svolgere al massimo la sua attività



- Approssimativamente il 30-40% del suo contenuto è presente nella membrana del globulo di grasso
- Nel latte scremato si trova legata alle lipoproteine
- La temperatura di conservazione del latte pastorizzato superiore a 30°C può determinare la **riattivazione della fosfatasi alcalina**



## FOSFATASI ALCALINA (Alkaline phosphatase - ALP)

(ai fini della sicurezza alimentare)

Adottata come parametro rapido per la verifica del processo di pastorizzazione, poiché è poco più resistente alla temperatura e al tempo richiesti per inattivare *Mycobacterium tuberculosis* e *Coxiella burnetii*.

Utilizzata anche per svelare eventuali aggiunte non dichiarate di latte crudo al latte pastorizzato.



**Tabella 56** – Effetti del riscaldamento del latte (dati che riguardano la pastorizzazione).

Distruzione o inattivazione	Temperatura (°C) da raggiungere per una durata di:								
	1 ora	30 mn	10 mn	5 mn	2 mn	1 mn	30 sec	15 sec	5 sec
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	55,6	57,8	60,6	62,5	65	66,6	68,3	70	72,8
<i>Escherichia coli</i>	59,5	62,2	64,5	65,8	67,6	68,9	70,5	71,7	74,5
<i>Brucella</i>		51,7	60		63				
Affioramento	62,2	64,5	65,8	67,8	69,5	70,5	72,7	74,5	
Fosfatasi	60,8	62,2	64,5	65,8	67,6	68,9	70,5	71,7	74,2
Perossidasi		72	74	75	77	78	79	80	81

Fonte: C. Alais - Scienza del latte (2000)





**REGOLAMENTO (CE) n. 2074/2005 DELLA COMMISSIONE** del 5 dicembre 2005  
recante modalità di attuazione relative a taluni prodotti di cui al regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e all'organizzazione di controlli ufficiali a norma dei regolamenti del Parlamento europeo e del Consiglio (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004, deroga al regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e modifica dei regolamenti (CE) n. 853/2004 e (CE) n. 854/2004

La **pastorizzazione** è ottenuta mediante un trattamento comportante:

- i) una temperatura elevata durante un breve periodo (almeno 72°C per 15 secondi);
- ii) una temperatura moderata durante un lungo periodo (almeno 63°C per 30 minuti); o
- iii) *ogni altra combinazione tempo-temperatura che permetta di ottenere un effetto equivalente, di modo che i prodotti diano una **reazione negativa al test di fosfatasi alcalina** immediatamente dopo aver subito tale trattamento.*





Istituto Zooprofilattico  
del Lazio e della Toscana



496  
2019

# Bulletin

of the International Dairy Federation

The technology of  
pasteurisation and its effect  
on the microbiological and  
nutritional aspects of milk



### Equivalent combinations of time and temperature

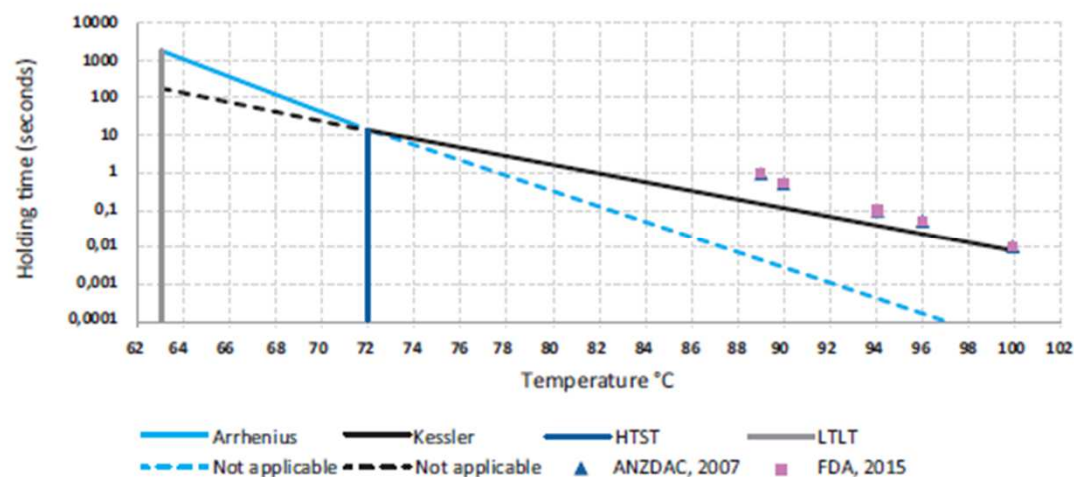


Figure 1. Minimum temperature-time combinations for pasteurisation. Batch (LTLT) pasteurisation is at 63°C for 30 min and continuous (HTST) pasteurisation is at 72°C for 15 s, assuming  $Z = 8^{\circ}\text{C}$ . Various guidelines exist on equivalent/appropriate time-temperature combinations above 72°C. Some of these are shown as symbols on the graph.





Istituto Zooprofilattico  
del Lazio e della Toscana



# Bulletin

516  
2022

of the International Dairy Federation

## Heat treatment of milk





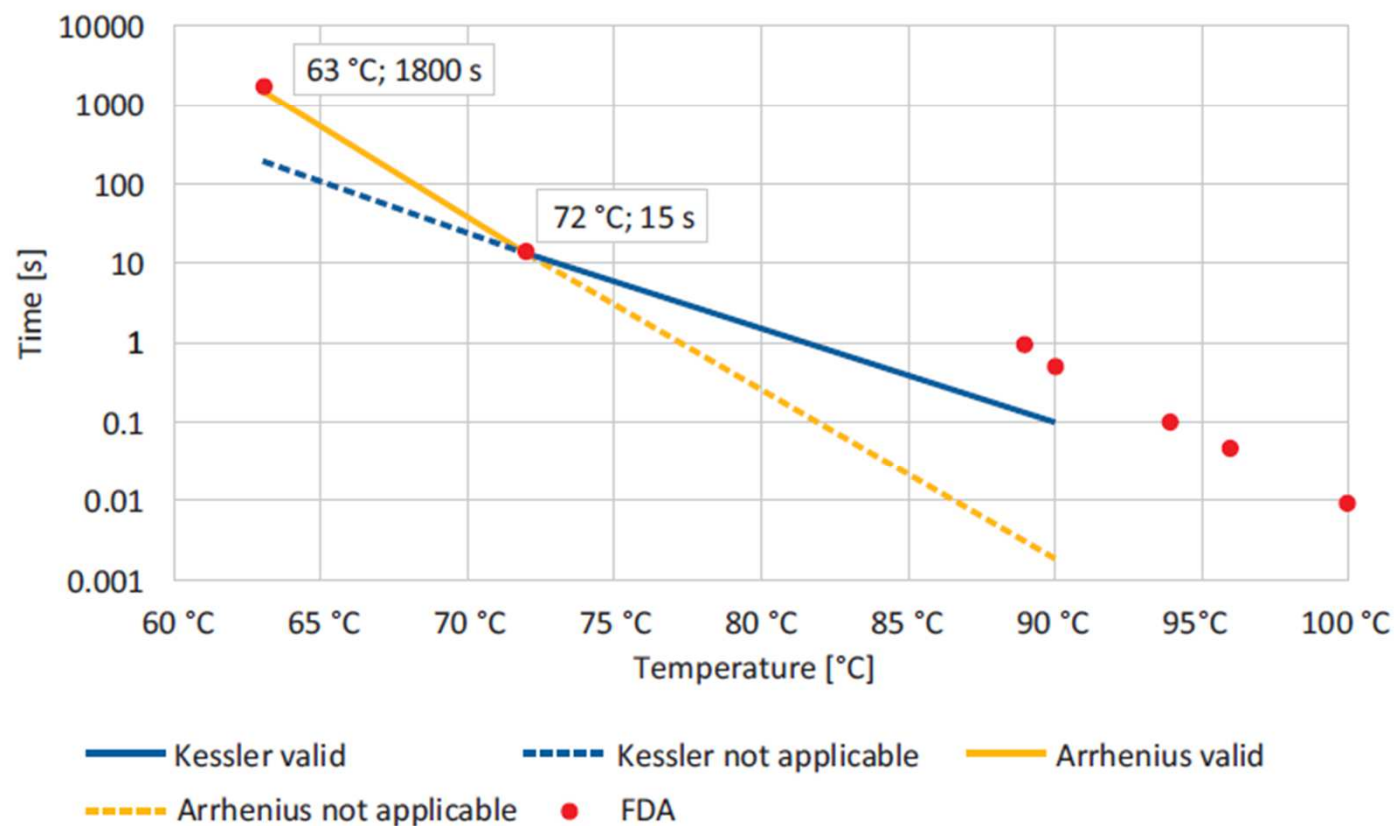


Figure 1. Minimum temperature/time combinations for pasteurisation. Batch (LTST) pasteurisation is at 63°C for 30 min and continuous (HTST) pasteurisation is at 72°C for 15 s. For  $\leq 72^\circ\text{C}$ , the values according to the Arrhenius equation are valid, for  $\geq 72^\circ\text{C} - 90^\circ\text{C}$ , the values according to the Kessler equation are valid. The FDA values are from CFR, title 21, part 131 [19].





## **Regolamento (CE) n. 1664/2006 della Commissione, del 6 novembre 2006, che modifica il regolamento (CE) n. 2074/2005**

per quanto riguarda le misure di attuazione per taluni prodotti di origine animale destinati al consumo umano e che  
abroga talune misure di attuazione

### *Articolo 6 bis*

### **Metodi di prova relativi al latte crudo e al latte trattato termicamente**

**I metodi di analisi di cui all'allegato VI *bis* del presente regolamento sono utilizzati dalle autorità competenti e, se del caso, dagli operatori del settore alimentare**

- per verificare la conformità ai limiti stabiliti dall'allegato III, sezione IX, capitolo I, parte III, del regolamento (CE) n. 853/2004 e
- **per garantire l'applicazione appropriata di un processo di pastorizzazione** ai prodotti lattiero-caseari conformemente all'allegato III, sezione IX, capitolo II, parte II, di detto regolamento (REQUISITI PER IL TRATTAMENTO TERMICO);



allegato VI bis sui metodi di prova relativi al latte crudo e al latte trattato termicamente è aggiunto al regolamento (CE) n. 2074/2005:

«ALLEGATO VI BIS

**METODI DI PROVA RELATIVI AL LATTE CRUDO E AL LATTE TRATTATO TERMICAMENTE**

CAPITOLO I

**DETERMINAZIONE DELLA CONTA BATTERICA MICROBICA E  
CONTA DELLE CELLULE SOMATICHE**

1. Per la verifica dei criteri di cui all'allegato III, sezione IX, capitolo I, parte III, del regolamento (CE) n. 853/2004 vanno applicate come metodi di riferimento le seguenti norme:
  - a) EN/ISO 4833 per la conta delle colonie a 30°C;
  - b) ISO 13366-1 per la conta delle cellule somatiche.
2. È accettabile l'impiego di metodi analitici alternativi (....)





«ALLEGATO VI BIS»

## METODI DI PROVA RELATIVI AL LATTE CRUDO E AL LATTE TRATTATO TERMICAMENTE

### CAPITOLO II

## DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA FOSFATASI ALCALINA

1.

Per la determinazione dell'attività della fosfatasi alcalina è applicata come metodo di riferimento la **norma ISO 11816-1**.

2.

L'attività di fosfatasi alcalina è espressa in milliunità di attività enzimatica per litro (mU/l). Un'unità di attività della fosfatasi alcalina corrisponde alla quantità di enzima fosfatasi alcalina che catalizza la trasformazione di 1 micromole di substrato al minuto.

3.

**Il risultato del test della fosfatasi alcalina è considerato negativo se l'attività misurata nel latte vaccino non è superiore a 350 mU/l.**

4.

L'impiego di metodi analitici alternativi è accettabile qualora i metodi siano convalidati in base al metodo di riferimento di cui al punto 1, conformemente ai protocolli approvati a livello internazionale.»



## METODI DI RIFERIMENTO:

### Norma ISO 11816-1:2013

#### Determination of alkaline phosphatase activity Part 1: Fluorimetric method for milk and milk-based drinks

UNI EN ISO 11816-1:2013 Determinazione dell'attività della fosfatasi alcalina. Parte 1: metodo fluorimetrico per latte e bevande a base di latte.

### Norma ISO 11816-2:2016

#### Determination of alkaline phosphatase activity Part 2: Fluorimetric method for cheese

UNI EN ISO 11816-2:2016 Determinazione dell'attività della fosfatasi alcalina. Parte 2: metodo fluorimetrico per il formaggio.







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Centro di Riferenza Nazionale  
per la Qualità del Latte e dei Prodotti Derivati  
degli Ovini e dei Caprini

## The Fluorophos® ALP Test System

Determining safe alkaline phosphatase levels with speed and accuracy

The Fluorophos ALP Test System takes phosphatase testing to its highest level by yielding quantitative results and eliminating subjective interpretation.

Studies prove its versatility when testing dairy products made from cow, goat, sheep, and other species.

The EU now requires that any other method considered for use be validated against the fluorimetric method and has lowered the statutory level for ALP in pasteurized milk from 500 to 350mU.

In May 2007, the European Union approved the fluorimetric method (ISO 11815-1:2007) as the "official reference" method used for ALP testing.

With the Fluorophos ALP Test System, you can closely monitor your production processes and anticipate quality control problems. The test can detect phishies and cooked seeds in your HSE system before they trigger pasteurization failures and workflow interruptions.

ADVANCED INSTRUMENTS, INC.  
Two Technology Way / 781-325-9000  
Norwood, Massachusetts 01908, USA  
800-225-4034 Fax: 781-325-9181  
www.advancedinstruments.com

**Greatest sensitivity**  
The Fluorophos ALP Test detects as little as 0.0001 raw milk contamination, making it many times more sensitive than any other method. Fluorophos actually exceeds the FDA and EU ALP detection criteria.

**Highest specificity**  
The Fluorophos' high level specificity eliminates false positives, and color or fat content variations in cheese and flavored products will not affect test results.

**Globally proven**  
Laboratories around the world are using the Fluorophos ALP Test in conjunction with a Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) program. The Fluorophos has been extensively studied and approved by the AOAC, ISO/IEC, CEN European Standards, and NCMS-VDA for confirming proper pasteurization.

**Fastest test available**  
Test results automatically appear in 3 minutes on the digital display. With one system you can test both cheese and other dairy products made from fluid milk.

**Reduced production liability**  
Documented reports indicate that improper pasteurization is still a public health concern, and in some cases has caused illness to consumers. Alarmingly, the milk in these cases was deemed acceptable by the testing methods used. Because the Fluorophos ALP Test detects ultra low levels of raw milk contamination, it offers unmatched protection against the threat of pathogens in pasteurized milk.

*The fastest and most sensitive test for confirming pasteurization*



**Fastest and accurate test available**  
The Fluorophos ALP Test System provides test results in just 3 minutes for confirmation of pasteurization. With just one reagent to prepare, and easy-to-follow display prompts, the Fluorophos eliminates user errors and ensures consistent results.



Running the Fluorophos ALP Test is fast and easy – simply add the milk sample to the vials...



Then place the vials in the Fluorophos instrument and push "Start". Test results will appear automatically in three minutes.

Available from:

12/2014 ALP

### The Fluorophos® ALP Test System Specifications

Sample capacity	Auto-ranging, automatic zero
Range	99 optical field filter
Options	±1 PPU (fluorescence unit)
Resolution	Low than 1 PPU/low
Drift	RS-232C, 1000/600/9600 baud
Communication	LabVIEW, 5 years
Memory backup	100-110 V (60 Hz) or 230-240 V (50 Hz)
Power	6" H x 16" W x 17" D (15 cm H x 41 cm W x 30 cm D)
Dimensions	35 lbs (16 kg)
Net weight	35 lbs (16 kg)
Shipping weight	One year limited warranty on workmanship and parts except glass, optics and parts warranted by their makers
Warranty	One year limited warranty on workmanship and parts except glass, optics and parts warranted by their makers



### The Fluorophos ALP Test Specifications

Test time	3 minutes
Sample size	75 µL
Sensitivity	0.0001 raw milk
Between run CV	RSD, 1.8%
Reagent stability	2 years from date of manufacture, refrigerated

### How-Line® Technical Service

Advanced Instruments' How-Line Service and worldwide dealer network provides comprehensive customer service and technical support.

In the United States and Canada, call (800) 225-4034. Monday through Friday, 9:00am to 4:30pm (EST). After operating hours, call 425-5151.

For more information on the Advanced Instruments family of tests, please call +1 (781) 325-9000 or email us at [info@advancedinstruments.com](mailto:info@advancedinstruments.com).







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



## PROVA VALUTATIVA INTERLABORATORIO PER LA FOSFATASI ALCALINA NEL LATTE OVINO Febbraio 2016

STRUMENTO					
FLUOROPHOS	Lab.1	1	2	3	4
		178,8	488,7	1121	1649
		217,4	498,3	1054	1731
FLUOROPHOS	Lab.2	189,4	561,8	1376,8	2019,9
		183,0	570,5	1413,1	2059,9
		126,0	433,0	1133,0	1489,0
FLUOROPHOS	Lab.3	124,0	451,0	1104,0	1522,0
		162,7	594,4	1422,8	1984,1
		164,6	610,9	1386,0	2143,1
FLUOROPHOS	Lab.4	173,9	549,8	1184,2	1839,7
		183,9	580,6	1304,2	1645,3
		Risultati KIT QUALITATIVO			
KIT ( pos/neg )	Lab.6	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
		Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
KIT ( pos/neg )	Lab.7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
KIT ( pos / neg )	Lab.8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo



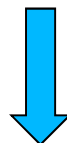
### **Fosfatasi microbica**

Tipo I - si inattiva a temperatura di pastorizzazione

Tipo II - NON si inattiva a temperatura di pastorizzazione

La struttura della fosfatasi microbica è simile a quella bovina.

I metodi oggi disponibili non distinguono tra le due forme di fosfatasi.



Il metodo prevede una pastorizzazione eseguita in laboratorio per comprendere se un valore elevato di fosfatasi in latte pastorizzato sia determinato dalla presenza di fosfatasi microbica resistente.



## Fosfatasi alcalina nel latte Ovino e Caprino

**Latte crudo** (dati CReLDOC)

Media latte ovino: 3.670.000 mU/L

Media latte caprino: 253.000 mU/L

Varia in relazione alla specie, razza, periodo di lattazione, stato di salute ed età.

Cellule somatiche elevate comportano l'aumento della ALP





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



### Latte crudo (dati CReLDOC)

Media latte ovino: 3.670.000 mU/L

Media latte caprino: 253.000 mU/L

Campioni di latte pastorizzato individuali di

**capra:** media

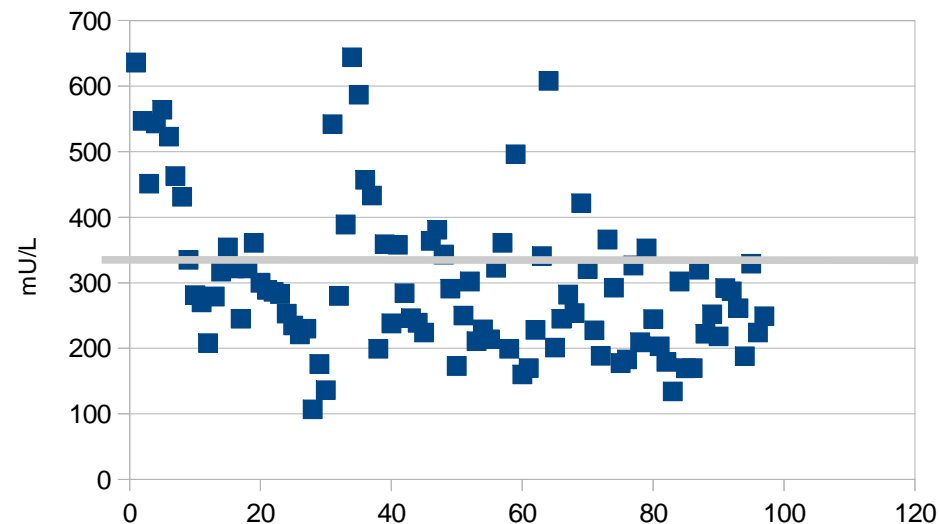
Sarde  $371,76 \pm 339,16$

Saanen  $47,39 \pm 29,62$

(Scintu M.F. et al. 1998)

### Latte ovino pastorizzato

63°C 30 minuti



Campioni di latte di massa pastorizzato di

**pecora:** media

$459 \pm 124$      $480 \pm 148$

$492 \pm 121$      $534 \pm 87$

$384 \pm 47$

(Scintu M.F. et al. 2001)



## **Progetto di ricerca corrente 2016:**

**ATTIVITA' DELLA FOSFATASI ALCALINA  
NEL LATTE DI PECORA, CAPRA E BUFALA  
IN RELAZIONE AL TRATTAMENTO TERMICO DI PASTORIZZAZIONE:  
STUDIO SPERIMENTALE  
PER UN LIMITE DI CONFORMITA'**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana “M. Aleandri” –  
( Sede di Roma – Sez. Latina – Sez. Grosseto )  
**Centro di Riferenza Nazionale per la Qualità del Latte e dei Prodotti Derivati  
degli Ovini e dei Caprini**

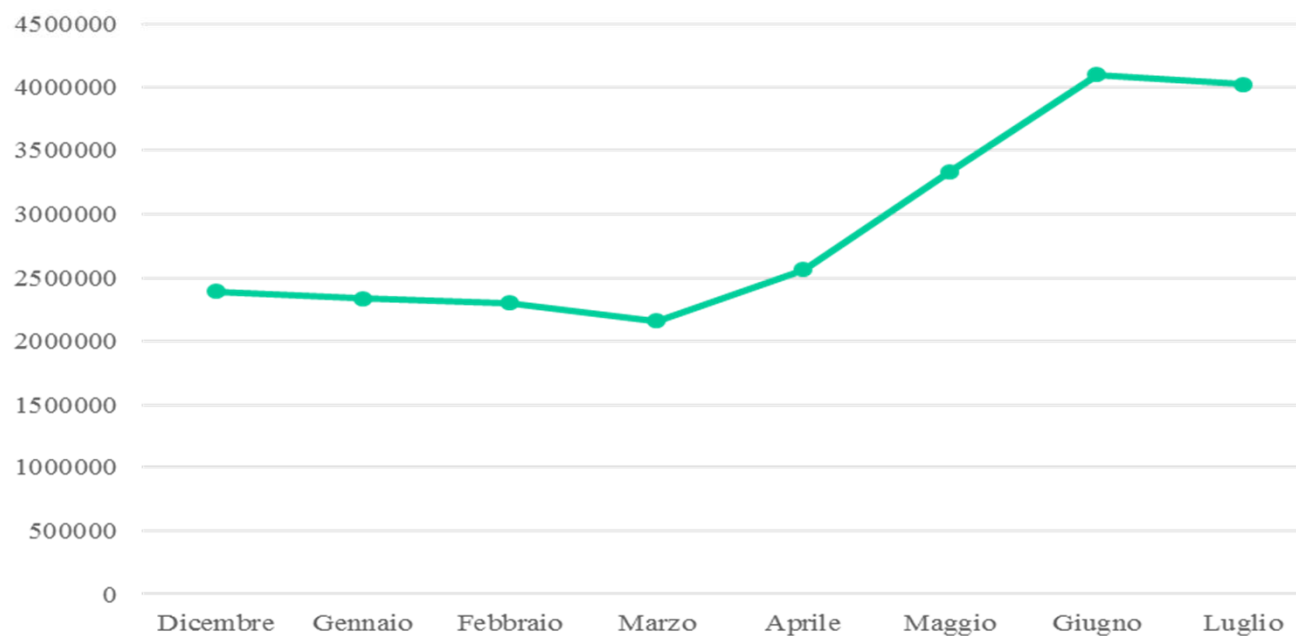
Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell’Emilia – Sede di Brescia –  
**Centro di Riferenza Nazionale per la Qualità del Latte Bovino**

Istituto Zooprofilattico de Mezzogiorno – Sezione Diagnostica di Salerno –  
**Centro di Riferenza Nazionale sull’igiene e le tecnologie dell’allevamento e delle  
produzioni bufaline**

Istituto Superiore della Sanità –  
**Laboratorio Nazionale di Riferimento per il latte e i prodotti a base di latte**



### Fosfatasi alcalina Latte ovino crudo



Latte crudo

Media 2.856.000  $\pm$  1.128.000mU/L

Latte pastorizzato

Media 246  $\pm$  54 mU/L



## Latte di PECORA

### Latte crudo

Media 2.856.000  $\pm$  1.128.000mU/L

### Latte pastorizzato

Media 246  $\pm$  54 mU/L

## Latte di CAPRA

### Latte crudo

Media 123.000  $\pm$  94.000mU/L

### Latte pastorizzato

Media 94  $\pm$  57 mU/L





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



# PROVA PRELIMINARE SPERIMENTALE FORMAGGIO OVINO





Contents lists available at [ScienceDirect](#)

**LWT - Food Science and Technology**

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



Short communication

## Alkaline phosphatase activity in cheese as a tracer for cheese milk pasteurization



Lotti Egger <sup>a,\*</sup>, Marina Nicolas <sup>b</sup>, Luisa Pellegrino <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Agroscope, Institute for Food Sciences, Schwarzenburgstr. 161, 3003 Bern, Switzerland

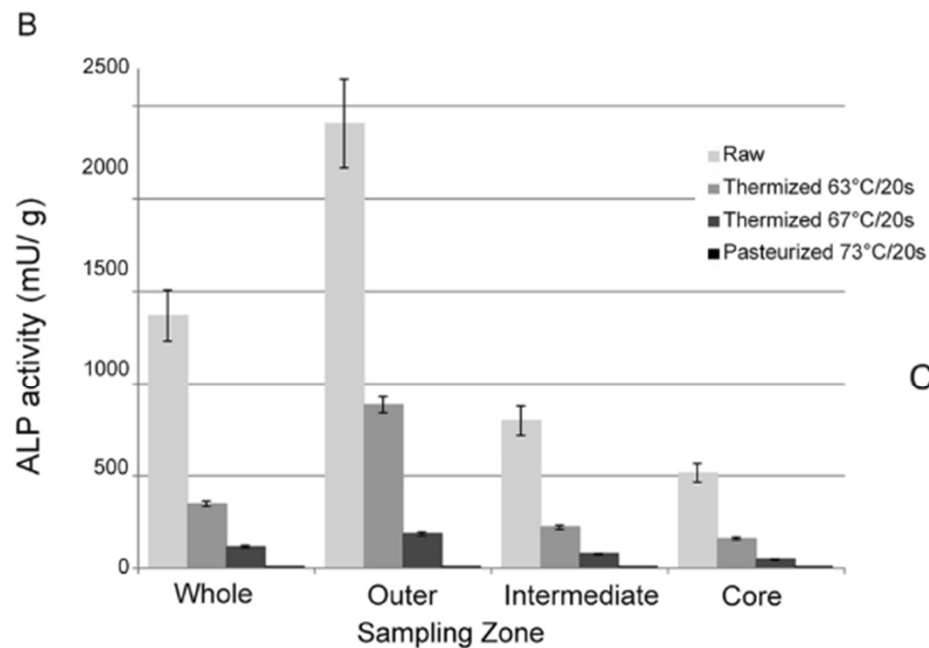
<sup>b</sup> National Reference Laboratory for Milk and Milk Products (EURL), Avenue du Général de Gaulle 23, 94706 Maisons Alfort Cedex, France

<sup>c</sup> Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences (DeFENS), University of Milano, Via Celoria 2, 20133 Milano, Italy

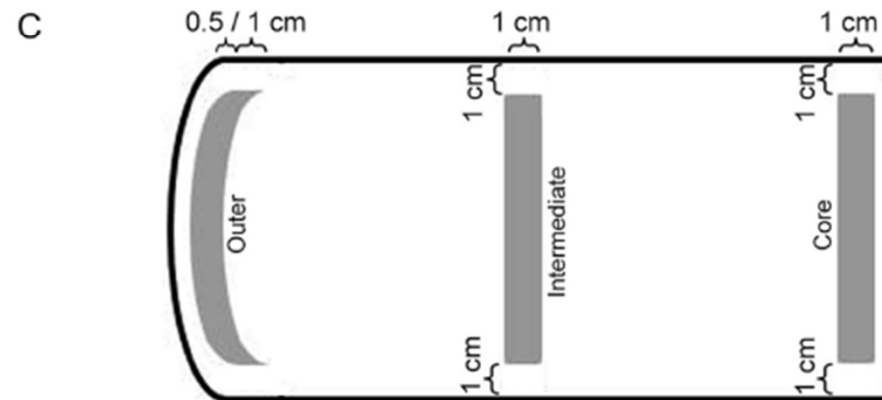
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.033>

0023-6438/© 2015 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)





ALP activities measured in different zones of the derived cheeses (B).



Sampling zones considered (C).

(Lotti E. et al Alkaline phosphatase activity in cheese as a tracer for cheese milk Food Science and Technology 2016)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.033>

0023-6438/© 2015 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Table 1

Compiled results of ALP activities measured in typical cheeses mainly from France, Italy and Switzerland. SD ¼ Standard deviation, N ¼ number of cheeses analyzed in duplicates. Values written in gray color: analysis of single cheese samples in duplicate (N ¼ 1).

	Cheese Type	Country	Pasteurized			Thermized			Raw		
			Average (mU/g)	SD (mU/g)	N	Average (mU/g)	SD (mU/g)	N	Average (mU/g)	SD (mU/g)	N
Soft Cheeses	Brie	F, CH	3	1	37	60	40	3	1913	565	12
	Camembert	F, CH	3	1	61	648	314	12	3687	928	20
	Acid curd cheese	F	2	1	3						
	Coulommiers	F	2	1	24	920	1109	2	2999	1449	5
	Stracchino	I	2	1	4						
	Limburger	CH	1	2	4						
	Vacherin Mont d'Or	CH				456	500	9			
	Tomme	F, CH	2	3	5	1589	26	2	4306	1869	8
	Chaource	F	5		1	864		1			
	Mascarpone	I	1		1						
Semi-Hard Cheeses	Appenzeller	CH							1284	895	10
	Cream Cheese	F, CH	1	1	8	93		1	3260		1
	Crotto	I	2	1	3						
	Flösser Cheese	CH				325	132	5			
	Mountain Cheese	CH				499	437	9			
	Raclette	F, CH	2	2	16				2643	1679	6
	Raschera	I				562	110	3	3522	1073	6
	St. Paulin	F, CH	2	2	7	77		1	9691		1
	Taleggio, Quattrolo	I	5	2	2				5060		1
	Tête de Moine	CH							3636	631	15
	Tilsiter	CH	0	0	6	1639	1508	6	2274		1
	Vacherin Fribourgeois	CH				102	103	4	3733	518	4
	Valtellina Casera	I	1	1	2						
	Winzer Cheese	CH				326	251	5			
	Caciotta Valle Alpina	I							1977		1
	Fontina	I							1447		1
	Montasio	I							300		1
	Spicy Max	CH				36		1			
Hard Cheeses	Bernese Hobelcheese	CH							3342	350	2
	Comté	F							1846	597	4
	Emmental	F	2	2	12						
	Emmental Switzerland	CH							1117	681	13
	Generic Grana Type	I	2	1	5	318	173	18	1435	745	8
	Grana Padano	I							954	288	134
	Gruyère	CH							1163	785	12
	Parmigiano Reggiano	I							781	299	114
	Sbrinz	CH							1236	711	6
	Switzerland Swiss	CH	0	0	6						

Pastorizzati: 3 mU/g  
Termizzati : 532 mU/g  
Crudi : 2650 mU/g

(Lotti E. et al Alkaline phosphatase activity in cheese as a tracer for cheese milk Food Science and Technology 2016)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.033>

0023-6438/© 2015 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

#### 4. Conclusions

Alkaline phosphatase activity is a pertinent marker for proper pasteurization of the cheese milk if the proposed cheese sampling, especially for hard cheeses, is respected and with exclusion of blue cheeses and pasta filata cheeses. Based on data obtained from over 700 individual samples from three different countries, a tentative limit for the ALP values of pasteurized cheeses can be set at 10 mU/g. The reliability of this limit is confirmed by literature data.

Nevertheless, further work on cheeses from other countries will be performed to support and confirm the applicability of the method as well as the tentative limit of 10 mU/g.

(Lotti E. et al Alkaline phosphatase activity in cheese as a tracer for cheese milk Food Science and Technology 2016)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.033>

0023-6438/© 2015 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



## Caseificio A - LATTE PASTORIZZATO - Prova 1

Latte e formaggi (primo sale, 20 gg), **STESSO LOTTO** di produzione

Data	Specie animale	Matrice	Stagionatura (gg)	Lotto caseificio	Risultato mU/L (latte) mU/g (form)	Risultato dopo 20 gg a T=3°C
25-gen	ovino	latte	/	22/024	315	
25-gen	ovino	formaggio	0	22/024	2	
16-feb	ovino	formaggio	20	22/024	3	
16-feb	ovino	latte	/	22/045	365	
16-feb	ovino	formaggio	0	22/045	18	
08-mar	ovino	formaggio	20	22/045	121	79
08-mar	ovino	latte	/	22/062	221	
08-mar	ovino	formaggio	0	22/062	3	
28-mar	ovino	formaggio	20	22/062	2	
28-mar	ovino	latte	/	22/083	128	
28-mar	ovino	formaggio	0	22/083	12	
15-apr	ovino	formaggio	20	22/083	2	
15-apr	ovino	latte	/	22/104	347	
15-apr	ovino	formaggio	0	22/104	2	
06-mag	ovino	formaggio	20	22/104	5	
06-mag	ovino	latte	/	22/125	207	
06-mag	ovino	formaggio	0	22/125	3	
25-mag	ovino	formaggio	20	22/125	2	
25-mag	ovino	latte	/	22/144	268	
25-mag	ovino	formaggio	0	22/144	4	
16-giu	ovino	formaggio	20	22/144	2	
16-giu	ovino	latte	/	22/167	197	
16-giu	ovino	formaggio	0	22/167	6	
06-lug	ovino	formaggio	20	22/167	2	

pastorizzazione  
69°C x 1 min.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

pastorizzazione  
69°C x 1 min.

### Caseificio A - LATTE PASTORIZZATO - Prova 2

Formaggi (90 e 180 gg) **DIVERSI LOTTI** di produzione

Data	Specie animale	Stagionatura (gg)	Risultato mU/g	Risultato dopo 20 gg a T=3°C
16-feb	ovino	90	3	
16-feb	ovino	180	1	
08-mar	ovino	90 interno	3	4
08-mar	ovino	90 esterno	2	3
08-mar	ovino	180 interno	5	2
08-mar	ovino	180 esterno	2	2
28-mar	ovino	90 interno	2	
28-mar	ovino	90 esterno	2	
28-mar	ovino	180 interno	6	
28-mar	ovino	180 esterno	8	
15-apr	ovino	90	5	
15-apr	ovino	180	2	
06-mag	ovino	90	5	
06-mag	ovino	180	7	
25-mag	ovino	90	2	
25-mag	ovino	180	3	
16-giu	ovino	90	2	
16-giu	ovino	180	6	
06-lug	ovino	90	2	
06-lug	ovino	180	2	







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Caseificio C - LATTE CRUDO				
formaggi (primo sale 0 e 20 gg), <b>diverso</b> lotto di produzione				
Data	Specie animale	Matrice	Stagionatura (gg)	Risultato mU/g
21-apr	ovino	formaggio Primo sale	0	1411
21-apr	ovino	formaggio Lotto diverso dal primo sale	20	451





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Riferenza Nazionale  
per la Qualità del Latte e dei Prodotti Derivati  
degli Ovini e dei Caprini



## SCIENTIFIC REPORT

APPROVED: 6 April 2021

doi: 10.2903/j.efsa.2021.6576

# **The use of alkaline phosphatase and possible alternative testing to verify pasteurisation of raw milk, colostrum, dairy and colostrum-based products**

European Food Safety Authority (EFSA),  
Ingrid Clawin-Rädecker, Jan De Block, Lotti Egger, Caroline Willis, Maria Teresa Da Silva Felicio  
and Winy Messens



## Appendix A – Strong evidence food-borne outbreaks in the EU from 2007 to 2019 associated with the consumption of milk and dairy products

**Table A.1:** Number of strong evidence food-borne outbreaks associated with the consumption of milk and dairy products (including cheese) by causative agent, animal species of origin of the milk and heat treatment of the milk or of the dairy products, as reported by the EU Member States during the period 2007–2019

Causative agent	Bovine species			Non-bovine species		Unspecified animal species			All species and possible heat treatments
	Pasteurised milk	Raw/unpasteurised milk	Unspecified heat treatment	Raw/unpasteurised milk	Unspecified heat treatment	Pasteurised milk	Raw/unpasteurised milk	Unspecified heat treatment	
<i>Salmonella</i> spp.	0	0	1	3	0	0	3	131	138
<i>Campylobacter</i> spp.	2	2	0	1	1	0	77	8	91
<i>Staphylococcal enterotoxins</i>	1	4	1	5	10	2	1	101	125
<i>Escherichia coli</i>	0	1	1	0	0	0	10	12	24
Flavivirus	0	0	0	12	8	0	0	4	24
<i>Bacillus</i> spp.	1	0	0	0	0	1	0	12	14
<i>Escherichia coli</i> , pathogenic	0	0	0	0	0	0	0	12	12
Histamine	0	0	0	0	0	0	0	6	6
<i>Brucella</i> spp.	0	0	0	1	0	0	1	3	5
Calicivirus	0	0	0	0	0	0	0	5	5
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	1	0	4	5
<i>Clostridium</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Cryptosporidium</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Rotavirus	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Yersinia</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<b>All causative agents</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>22</b>	<b>19</b>	<b>4</b>	<b>94</b>	<b>300</b>	<b>453</b>

## References

Giangolini G, 2020. Re: use of ALP to verify pasteurisation in non-bovine species.  
Message to Katrin Bote. 14 December 2020. E-mail.

IZSLT (Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana “M. Aleandri”), 2020. Sintesi –  
Attività della fosfatasi alcalina nel latte di pecora, capra e bufala in relazione al trattamento termico  
di pastorizzazione: studio sperimentale per un limite di conformità.  
Progetti di Ricerca Corrente 2016. N. identificativo progetto: IZSLT 06/16 RC, 3 pp.  
<http://www.izslt.it/bpractices/wp-content/uploads/2020/05/Sintesi-6.pdf>



## considerazioni conclusive

### VARIABILITA' della FOSFATASI ALCALINA nei FORMAGGI

- A latte pastorizzato
- A latte crudo
- Diverse specie produttrici di latte
- Tecnologia casearia
- Stagionatura
- Zona di prelievo del saggio di prova
- Riattivazione (?)





## considerazioni conclusive

- Risultati sperimentali coerenti con i dati bibliografici
- Bibliografia ancora scarsa relativamente ai formaggi ovini e caprini
- Formazione e informazione
- Maggiore diffusione di metodi accreditati



## considerazioni conclusive

**350 mU/L**

è il limite fissato per il latte bovino pastorizzato dal  
**Regolamento (CE) n. 1664/2006** della Commissione, che  
modifica il regolamento (CE) n. 2074/2005

**N.B. non esiste un limite legislativo  
per il latte delle altre specie  
(e nemmeno per il formaggio)**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



...grazie!

