

# QUALITÀ E SICUREZZA MICROBIOLOGICA NEI SISTEMI ALIMENTARI

## ELMINTI

**TRICHINOSI.** La trichinosi è una infestazione da *Trichinella spiralis*, un nematode di circa 2mm. Nello stomaco dell'ospite, le cisti liberano le larve che migrano nell'intestino, dove diventano adulti. Dopo la fecondazione vengono in parte scaricate all'esterno con le feci e in parte penetrano la mucosa intestinale grazie al proprio stilo, risalgono i vasi linfatici e si incistano nel tessuto muscolare. Gli ospiti definitivi sono i suini e quelli intermedi i roditori, mentre l'uomo è un ospite accidentale. Tra le procedure di prevenzione e controllo ritroviamo: (i) presidio veterinario presso allevamenti e macello, con particolare attenzione alla disinfestazione da roditori, (ii) l'applicazione delle buone pratiche igieniche e (iii) preparazioni alimentari di cottura a 75°x30s o congelamento a -18°x96h.

**OSSIURIASI.** L'ossiuriasi è un'infestazione da *Enterobius vermicularis*, un nematode di colore bianco e dimensioni ridotte (4mm). Le uova si schiudono nel tenue e si trasformano in larve, le quali si spostano nel crasso dove si ha la fecondazione; le femmine fecondate migrano nella zona perianale a liberare le uova. L'uomo è l'ospite definitivo e non si presentano ospiti intermedi. Tra le procedure di prevenzione e controllo ritroviamo una corretta gestione dei sistemi di potabilizzazione dell'acqua e l'applicazione di buone norme igieniche.

**ANISAKIASI.** L'anisakiasi è una infestazione da *Anisakis simplex*, un nematode di 2cm dotato di cuticola per la resistenza all'ambiente gastrico. Le uova liberate in acqua dai mammiferi marini si trasformano in larve, che vengono rilasciate libere in acqua e successivamente ingerite da crostacei, all'interno dei quali maturano nella forma dannosa per l'uomo (L3). A questo punto i crostacei possono essere direttamente utilizzati come alimento dall'uomo oppure predati da pesci e/o molluschi, che una volta morti vedono le larve incistarsi nel proprio tessuto muscolare, del quale l'uomo o altri predatori marini si nutrono. I pesci sono gli ospiti definitivi, mentre l'uomo è un ospite accidentale. Tra le procedure di prevenzione e controllo ritroviamo: (i) presidio veterinario presso l'allevamento ittico e dopo la pesca, con ispezione del tessuto muscolare, (ii) l'applicazione delle buone pratiche igieniche e (iii) preparazioni alimentari di cottura a 60°x60s o congelamento a -20°x24h o ancora concentrazioni saline >10%x45gg.

**TENIASI.** La teniasi è un'infestazione da *Taenia saginata* o *T. solium*, cestodi di lunghezza variabile da pochi millimetri a qualche metro che presentano come ospite definitivo bovini e suini, rispettivamente; l'uomo è un ospite accidentale. Le oncosfere si schiudono nell'intestino tenue dove, grazie allo scolice munito di ventose e rostrello uncinato, aderiscono alla parete dell'organo; successivamente, esse penetrano la barriera intestinale e raggiungono il tessuto muscolare, dove si incistano. Tra le procedure di prevenzione e controllo ritroviamo: (i) presidio veterinario presso allevamenti e macello, (ii) l'applicazione delle buone pratiche igieniche e (iii) preparazioni alimentari di cottura a 75°x30s o congelamento a -18°x96h.

**ECHINOCOCCOSI.** L'echinococcosi è un'infestazione da *Echinococcus granulosus*, un piccolo cestode segmentato in tre proglottidi: una immatura, una matura ed una gravida. Da quest'ultima, attraverso le feci dell'ospite definitivo (canidi), si liberano le uova che, nell'ospite intermedio (ovini), rilasciano le oncosfere a livello del tenue. Qui, grazie allo scolice munito di ventose e rostrello uncinato, esse aderiscono alla parete e vi penetrano fino a raggiungere, tramite il sistema circolatorio, fegato e polmoni, dove si incistano. L'uomo è un ospite accidentale. Tra le procedure di prevenzione e controllo ritroviamo: (i) presidio veterinario presso allevamenti e macello, (ii) l'applicazione delle buone pratiche igieniche e (iii) preparazioni alimentari di cottura a 75°x30s o congelamento a -18°x96h.

**FASCIOLIASI.** La fascioliasi è un'infestazione da *Fasciola hepatica*, un trematode di circa 20-30mm che infesta le vie biliari e le colecisti degli erbivori e può accidentalmente colpire l'uomo. Le uova rilasciate nelle acque dolci maturano in miracidio (larve) in circa due settimane. Nell'ospite intermedio, un mollusco del genere *Lymnaea*, ciascun miracidio rilascia circa 600 sporocisti, che si trasformano in redie. Le redie maturano in cercarie, rilasciate nelle acque, attraverso le quali raggiungono i vegetali, nei quali si incistano come metacercarie a livello fogliare. Tra le procedure di prevenzione e controllo ritroviamo: (i) presidio veterinario presso allevamenti e macello, (ii) l'applicazione delle buone pratiche igieniche e agrarie e (iii) preparazioni alimentari di cottura a 75°x30s o congelamento a -18°x96h.

## PROTOZOI

**GIARDIASI.** La giardiasi è una parassitosi causata dal protozoo flagellato *Giardia lamblia*, che si presenta nella sua forma di resistenza (ciste) all'interno di materiale fecale che contamina acqua e alimenti o nel suolo. Dopo aver passato la barriera gastrica grazie alla propria spessa parete esterna, nell'intestino tenue la ciste si sviluppa in trofozoite, che si riproduce per scissione binaria e aderisce alla superficie intestinale mediante ventose, danneggiando gravemente gli enterociti e inducendo uno stato infiammatorio (enterite) che si traduce in sintomi quali diarrea e dolore addominale. La trofozoite si incista nuovamente per il passaggio attraverso il colon e l'espulsione con le feci. Gli ospiti definitivi sono animali da allevamento e compagnia, mentre l'uomo è un ospite accidentale. Tra le procedure di prevenzione e controllo ritroviamo: (i) la gestione dei sistemi di potabilizzazione dell'acqua, (ii) l'applicazione delle buone pratiche igieniche e (iii) preparazioni alimentari di cottura a 75°x30s.

**AMEBIASI.** L'amebiasi è una parassitosi causata dall'amebozoo *Entamoeba histolica*, che si presenta nella sua forma di resistenza (ciste) all'interno di materiale fecale che contamina acqua e alimenti o nel suolo. Dopo aver passato la barriera gastrica grazie alla propria spessa parete esterna, nell'intestino tenue la ciste si sviluppa in trofozoite, che si riproduce per scissione binaria e aderisce alla superficie intestinale mediante ventose, danneggiando gravemente gli enterociti e inducendo uno stato infiammatorio (enterite) che si traduce in sintomi quali diarrea e dolore addominale. Il parassita può anche migrare nel fegato, polmoni e cervello. La trofozoite si incista nuovamente per il passaggio attraverso il colon e l'espulsione con le feci. Gli ospiti definitivi sono l'uomo e i primati. Tra le procedure di prevenzione e controllo ritroviamo: (i) la gestione dei sistemi di potabilizzazione dell'acqua, (ii) l'applicazione delle buone pratiche igieniche e (iii) preparazioni alimentari di cottura a 75°x30s.

**TOXOPLASMOSI.** La toxoplasmosi è una parassitosi causata dallo sporozoo *Toxoplasma gondii* e diffusa attraverso contaminazione di feci contenenti oocisti; risulta auto-limitante negli individui adulti sani, ma porta a complicazioni gravi nel feto/neonato e in pazienti immunodepressi. Nell'ospite definitivo (gatto), dalle oocisti fuoriescono, grazie all'azione dei succhi digestivi, gli sporozoi, che penetrano gli enterociti. Nell'ospite accidentale, invece, le micronemie delle tachizoite perforano le *gap junction* per superare la barriera intestinale. Una volta raggiunto il tessuto nervoso, gli enzimi tirosina idrossilasi, codificati dai geni plasmidiali e coinvolti nella formazione di un precursore della dopamina, causano danni al tessuto nervoso. Tra le procedure di prevenzione e controllo ritroviamo: (i) la gestione dei sistemi di potabilizzazione dell'acqua, (ii) l'applicazione delle buone pratiche igieniche e (iii) preparazioni alimentari di cottura a 75°x30s; le donne in gravidanza sieronegative ad anti-*T.gondii*-IgG devono astenersi dal consumare prodotti carnei e vegetali crudi.

**CRITOSPORIDIOSI.** La criptosporidiosi è una parassitosi causata dallo sporozoo *Cryptosporidium parvum* e diffusa attraverso contaminazione fecale di cibo e acqua o mediante contatto con superfici non sanificate. Le oocisti si schiudono nell'intestino rilasciando gli sporozoi, che infettano gli enterociti formando un vacuolo parassitoforo, all'interno del quale si riproducono per mitosi formando i merozoiti per l'infezione delle cellule circostanti. Gli ospiti sono i mammiferi. Tra le procedure di prevenzione e controllo ritroviamo: (i) la gestione dei sistemi di potabilizzazione dell'acqua, (ii) l'applicazione delle buone pratiche igieniche e (iii) preparazioni alimentari di cottura a 75°x30s.

## BATTERI GRAM NEGATIVI

**SALMONELLA.** Il meccanismo di infezione è mediato da vari elementi specifici. Le adesine (fimbrie specializzate) legano recettori specifici posti sulle cellule M delle placche del Peyer e sugli enterociti, dopodiché il sistema di secrezione di tipo III apre un varco nella cellula ospite. Le invasine inducono la riorganizzazione dell'actina e la degenerazione dei microvilli. Il batterio viene quindi endocitato all'interno di un macrofago, nel quale prolifera e dal quale si libera inducendone l'apoptosi. Le citotossine prodotte dal batterio attivano l'adenilato ciclasi: la formazione di cAMP provoca l'attivazione della PKA che perturba i canali ionici di membrana, portando alla fuoriuscita di ioni cloruro: questi, richiamando ioni sodio, attirano acqua nel lume intestinale provocando diarrea acquosa. I batteri del genere *Salmonella* possono colonizzare gli apparati gastroenterici di molti animali da allevamento, per questo è necessario un presidio veterinario presso allevamento e macello (15-20% dei casi di contaminazione); sono anche

possibili eventi di contaminazione secondaria. Particolare attenzione va posta alla filiera avicola, soprattutto negli allevamenti intensivi, visto che le molecole antibiotiche vengono veicolate tramite il mangime e gli animali potrebbero sviluppare resistenza ad esse in caso di somministrazione eccessiva. È possibile modificare principalmente tre parametri per impedire la crescita dei batteri: una temperatura inferiore a 5°C o superiore a 46°C, un pH di 4.4 o un valore di acqua libera di 0.97 (4.5% di NaCl).

- La febbre tifoide è un'infezione che si trasmette attraverso il contatto diretto o il circuito oro-fecale ed è causata da una dose infettante di  $10^2$  cellule di *Salmonella typhi* o *S. paratyphi*. Si osserva un periodo di incubazione di due settimane, dopo il quale si manifestano i primi sintomi che evolvono e perdurano per un mese circa: inizialmente si presentano astenia, cefalea e splenomegalia, seguiti da febbre alta, diarrea e roseola; talvolta si osservano complicazioni e perforazioni intestinali. La terapia prevede la somministrazione di antibiotici, l'isolamento del paziente e la disinfezione ambientale. L'uomo è il serbatoio naturale del batterio, con 16mln di casi e 600mila decessi annui.
- La salmonellosi è una gastroenterite causata dall'infezione di *Salmonella enteridis* o *S. typhimurium* ( $10^4$  cellule). Si osserva un periodo di incubazione che varia da poche ore a qualche giorno, dopodiché si manifestano i sintomi che durano per circa una settimana: vomito, diarrea, dolori addominali e febbre media. La terapia è di tipo reidratante ed è prevista la somministrazione di antibiotici solo nei casi più gravi. Gli animali sono i serbatoi naturali e possono trasmetterla all'uomo mediante contaminazione fecale di acqua e alimenti; si riscontrano circa 800mln di casi con 2mln di decessi annui.

**COLITE EMORRAGICA.** La colite emorragica è una grave infezione intestinale che si trasmette mediante contatto diretto uomo-animale o indiretto per consumo di alimenti contaminati ed è causata da una dose infettante di  $10^2$  cellule di *E. coli* enteroemorragici. Dopo qualche giorno di incubazione si osservano i sintomi: dolori addominali acuti, mal di testa, febbre media, edema intestinale e diarrea sanguinolenta; nel 10% dei casi si presenta anche sindrome emolitico-uremica causata da danni all'endotelio renale. Viene diagnosticata tramite analisi del sangue o radiologica/endoscopica della mucosa intestinale. Il paziente viene ricoverato in ospedale e trattato con antibiotici; se necessario, viene sottoposto a dialisi. Le popolazioni più a rischio sono i bambini, gli anziani e le persone immuno-depresse. Il meccanismo di infezione è mediato da vari elementi specifici. L'intimina procura aderenza alla membrana degli enterociti, distruggendo i microvilli. I fagi lisogeni codificano per STX1 e 2, che legano il recettore di superficie Gb3, permettendo l'internalizzazione nella cellula: qui, legando l'rRNA 28S, bloccano la sintesi proteica. Le STX stimolano la produzione di TNF $\alpha$  e IL-6, promuovendo infiammazione ed esposizione di Gb3 sulla superficie cellulare; nello specifico, STX2 presenta maggiore affinità per Gb3 delle cellule renali. È possibile modificare principalmente tre parametri per impedire la crescita dei batteri: una temperatura inferiore a 6°C o superiore a 46°C, un pH di 4.4 o un valore di acqua libera di 0.97 (4.5% di NaCl).

**CAMPILOBATTERIOSI.** La campilobatteriosi è una grave infezione intestinale causata da una dose infettante di  $5 \times 10^2$  cellule di *Campylobacter jejuni*. Dopo una settimana di incubazione si osservano i sintomi: crampi addominali, febbre media, nausea, vomito, astenia e diarrea, talvolta sanguinolenta e mucosa. Viene diagnosticata tramite analisi del sangue o radiologica/endoscopica della mucosa intestinale. Il paziente viene ricoverato in ospedale solo nei casi più gravi, altrimenti è sufficiente una terapia reidratante ed antibiotici. Le popolazioni a rischio sono i bambini, gli anziani e le persone immuno-depresse, in cui l'evoluzione maligna porta all'infiammazione di ileo, colon e peritoneo e alla sindrome di Guillan-Barrè, una patologia autoimmune che danneggia il SN periferico portando alla paralisi progressiva degli arti. Il meccanismo di infezione è mediato da vari elementi specifici. Il flagello del batterio ne permette l'avvicinamento agli enterociti, ai quali aderisce grazie alla mediazione delle adesine CBF1 e CadF. Si ha poi l'internalizzazione mediante endocitosi preceduta da danneggiamento dei microvilli o per passaggio attraverso le giunzioni strette. Proliferando, il batterio produce la tossina Cdt che porta alla distruzione del citoscheletro e del DNA della cellula ospite. Presenta inoltre dei geni plasmidiali di resistenza ai chinoloni, antibiotici che bloccherebbero i suoi enzimi girasi e topoisomerasi IV, necessari alla replicazione del proprio materiale genetico. È possibile modificare principalmente tre parametri per impedire la crescita dei batteri: una temperatura inferiore a 20°C o superiore a 48°C, un pH di 5.0 o un valore di acqua libera di 0.96. *C. jejuni* colonizza gli apparati gastroenterici di uccelli da allevamento e selvaggi. Bisogna porre particolare attenzione al processo di macellazione, in cui si osserva il 20% dei casi di contaminazione, e a possibili contaminazioni secondarie. Anche la filiera avicola presenta

varie criticità, soprattutto negli allevamenti intensivi, visto che le molecole antibiotiche vengono veicolate tramite mangime e gli animali potrebbero manifestare resistenza ad esse in caso di somministrazione eccessiva.

**YERSINIOSI.** La yersiniosi è una grave infezione intestinale causata da una dose infettante di  $10^4$  cellule di *Yersinia enterocolitica*. Dopo qualche giorno di incubazione, si osservano i sintomi: vomito, diarrea talvolta sanguinolenta, febbre media e infiammazione dei linfonodi mesenterici, del peritoneo e dell'ileo. Viene diagnosticata tramite analisi del sangue o radiologica/endoscopica della mucosa intestinale. Il paziente viene ricoverato in ospedale e sottoposto a terapia reidratante ed antibiotica. Il meccanismo di infezione è mediato da vari elementi specifici. Il plasmidio pYV dei ceppi virulenti codifica per numerose proteine di parete che mediano l'adesione alle cellule M delle placche del Peyer; a questo punto, le invasine codificate dai geni *ail* e *inv* provocano la degenerazione dei microvilli e l'internalizzazione nella cellula. Qui, l'enterotossina Yst induce la guanilato ciclasi: la formazione di cGMP provoca l'attivazione della PKGII che perturba i canali ionici di membrana, portando alla fuoriuscita di ioni cloruro e bicarbonato. Questi ultimi attraggono ioni sodio e di conseguenza acqua, determinando i fenomeni diarroici. È possibile modificare principalmente tre parametri per impedire la crescita dei batteri: una temperatura inferiore a  $-2^{\circ}\text{C}$  o superiore a  $45^{\circ}\text{C}$ , un pH di 4.6 o un valore di acqua libera di 0.96. *Y. enterocolitica* colonizza gli apparati gastroenterici di molti animali da allevamento e selvaggi (roditori). Bisogna porre particolare attenzione al processo di macellazione, in cui si osserva il 20% dei casi di contaminazione.

## BATTERI GRAM POSITIVI

**LISTERIOSI.** La listeriosi è un'infezione sistemica causata da una dose infettante di  $10^3$  cellule di *Listeria monocytogenes*. Inizialmente si presentano sintomi simil-influenzali, che poi evolvono in altri più gravi: gastroenterite, epatite, splenite, nefrite, setticemia, encefalite, meningite; è causa di aborto in animali e umani. Si osserva una letalità del 15%, con un aumento sino al 30% nelle popolazioni a rischio (bambini, anziani, immunodepressi). Il paziente viene ospedalizzato e trattato con antibiotici. Gli animali e l'ambiente sono il serbatoio naturale del batterio. Il meccanismo di infezione è mediato da vari elementi specifici. Le internaline A e B legano la cadherina-E posta sulle cellule M delle placche del Peyer e sugli enterociti intestinali, dopodiché il batterio viene endocitato in un vacuolo, dal quale fuoriesce prima della fusione con il lisosoma grazie all'azione di listeriolisina O e fosfolipasi A e B. La listeriolisina O è un emolisina (lisa gli eritrociti): gli isolati clinici sono sempre risultati emolitici, mentre quelli non-emolitici non hanno mai dimostrato patogenicità. Il batterio si moltiplica nel citoplasma, anche grazie all'azione della mureina idrolasi p60, e rilascia ActA, che induce la nucleazione delle microfibrille di actina per l'invasione delle cellule adiacenti. Sono vari gli elementi esposti a contaminazione: mangime, concime, acqua, attrezzatura per la mungitura, ambiente del macello. Tra i prodotti più frequentemente contaminati ritroviamo: latte crudo e formaggi a breve e media stagionatura a crosta fiorita o lavata, carne cruda, salumi crudi freschi o a breve stagionatura, pesce crudo, salmone e aringa affumicati e preparazioni gastronomiche refrigerate. È possibile modificare principalmente tre parametri per impedire la crescita dei batteri: una temperatura inferiore a  $-1^{\circ}\text{C}$  o superiore a  $46^{\circ}\text{C}$ , un pH di 4.4 o un valore di acqua libera di 0.92 (11.9% NaCl).

**Bacillus cereus.** Il serbatoio naturale del batterio sono gli animali e l'ambiente esterno. Le fonti di contaminazione della filiera alimentare sono varie: coltivazione, ambienti di produzione, processi di preparazione e conservazione del pasto; per evitare la contaminazione, quest'ultimo deve essere conservato in abbattitore a temperature  $<4^{\circ}\text{C}$  o mantenuto a più di  $60^{\circ}\text{C}$ . Gli alimenti maggiormente coinvolti sono preparazioni a base di amido e prodotti animali e vegetali. È possibile modificare principalmente tre parametri per impedire la crescita dei batteri: una temperatura inferiore a  $5^{\circ}\text{C}$  o superiore a  $50^{\circ}\text{C}$ , un pH di 4.5 o un valore di acqua libera di 0.94 (9.4% NaCl).

- L'ingestione di un alimento sul quale è presente una tossina preformata da *Bacillus cereus*, il cereulide, causa la sindrome emetica. Il cereulide è un peptide ciclico composto da 12 amminoacidi apolari, termostabile ( $121^{\circ}\text{C} \times 90\text{min}$ ), insensibile a proteasi e resistente a valori estremi di pH (2-11). È uno ionoforo, ciò significa che aumenta la permeabilità di membrana ad alcuni ioni metallici, dissipando il loro gradiente; inoltre, esso determina la perdita del potenziale di membrana mitocondriale, il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa e stimola il nervo vago legando un recettore per la serotonina. Dopo un periodo di incubazione di 1-6 ore, si manifestano i sintomi: vomito, crampi e nausea. Il paziente viene trattato con terapia reidratante.

- L'ingestione di alimenti contaminati da spore o cellule vegetative ( $10^4$ ) di *Bacillus cereus* causa la sindrome diarroica. Una volta raggiunto il tenue, tali cellule producono tre tossine: emolisina, enterotossina non emolitica e citotossina K. Si tratta di polipeptidi termolabili, instabili a  $\text{pH} < 4$  e sensibili all'azione di proteasi; le prime due tossine citate formano dei pori nella membrana dell'enterocita, determinando perdita di potenziale e conseguente disregolazione ionica che porta a diarrea acquosa. I sintomi si presentano dopo un periodo di incubazione di 8-24 ore. Il paziente viene trattato con terapia reidratante.

***Clostridium botulinum*.** L'ingestione di un alimento sul quale è presente la neurotossina rilasciata da *Clostridium botulinum* causa il botulismo alimentare (intossicazione), mentre l'ingestione di spore del batterio che germinano nell'intestino producendo le neurotossine botuliniche determina botulismo infantile (tossinfezione). In entrambi i casi si manifestano sintomi quali nausea, vomito, vertigini, secchezza delle fauci, pupille dilatate, paralisi muscolare progressiva e insufficienza respiratoria fino anche alla morte del soggetto (letalità del 60%). Il paziente viene ricoverato in terapia intensiva e trattato con lassativi, antitossine e ventilazione artificiale. Il serbatoio naturale del batterio sono gli ambienti anossici e l'intestino di vertebrati e insetti. Le spore attraversano la barriera gastrica e raggiungono l'intestino, dove germinando rilasciando le neurotossine; si tratta di sette polipeptidi termolabili ( $100^{\circ}\text{C}$ -5min o  $80^{\circ}\text{C}$ -15min) che bloccano il rilascio di acetilcolina nel punto di giunzione neuro muscolare causando la paralisi. La catena pesante, legandosi al recettore SV2 dell'assone neuronale, viene endocitata. La catena leggera è una metalloproteina a zinco: essa permette la fuoriuscita dalla vescicola endocitica verso il citoplasma, dove vengono degradate la proteina SNAP25, la syntaxina e la sinaptobrevina, necessarie per il rilascio del NT. La contaminazione può avvenire durante la coltivazione o la trasformazione. Gli alimenti maggiormente coinvolti sono conserve artigianali o semi-industriali di matrice animale e vegetale. È possibile modificare principalmente tre parametri per impedire la crescita dei batteri: una temperatura inferiore a  $6^{\circ}\text{C}$  o superiore a  $46^{\circ}\text{C}$ , un pH di 4.6 o un valore di acqua libera di 0.94 (9.4% NaCl); inoltre, il nitrito di sodio e quello di potassio prevengono la germinazione delle spore mediante inattivazione NO-mediata degli enzimi batterici ferro-zolfo, come la ferredossina.

***Clostridium perfringens*.** L'ingestione di alimenti contaminati da spore o cellule vegetative ( $10^4$ ) di *Clostridium perfringens* causa la sindrome diarroica. Una volta raggiunto il tenue, tali cellule producono l'enterotossina CPE, un polipeptide termolabile ( $74^{\circ}\text{C}$  x 10s o  $60^{\circ}\text{C}$  x 10min) che utilizza le claudine delle giunzioni strette come recettore: il legame con esse induce la formazione di pori nella membrana cellulare degli enterociti e il conseguente influxo di ioni calcio che portano all'apoptosi. Il batterio può anche produrre le tossine alfa e beta, che inducono rispettivamente gangrena gassosa ed enterite necrotizzante. I sintomi, che si presentano dopo un periodo di incubazione di 12-24 ore, sono rappresentati da nausea, dolori addominali, meteorismo e diarrea acquosa. Il paziente viene trattato con terapia reidratante. Le fonti di contaminazione della filiera alimentare sono varie: coltivazione, ambienti di allevamento, macellazione e produzione, processi di preparazione e conservazione del pasto; per evitare la contaminazione, quest'ultimo deve essere conservato in abbattitore a temperature  $< 4^{\circ}\text{C}$  o mantenuto a più di  $60^{\circ}\text{C}$ . Gli alimenti maggiormente coinvolti sono preparazioni gastronomiche a base di carne, pesce e vegetali, salse, spezie ed erbe aromatiche. È possibile modificare principalmente tre parametri per impedire la crescita dei batteri: una temperatura inferiore a  $6^{\circ}\text{C}$  o superiore a  $50^{\circ}\text{C}$ , un pH di 4.8 o un valore di acqua libera di 0.94 (9.4% NaCl); inoltre, il nitrito di sodio e quello di potassio prevengono la germinazione delle spore mediante inattivazione NO-mediata degli enzimi batterici ferro-zolfo, come la ferredossina.

***Staphylococcus aureus*.** L'ingestione di alimenti contaminati da  $1\mu\text{g}$  di enterotossina prodotta da *Staphylococcus aureus*, un saprofito delle mucose di naso e gola, può determinare, dopo un periodo di incubazione di 1-6 ore, sintomi quali: nausea, vomito, dolori addominali, diarrea e ipotensione da perdita di liquidi; alcuni individui possono essere portatori asintomatici del batterio. Per ristabilirsi è sufficiente reidratazione e riposo. Il batterio prolifera nella matrice alimentare e sintetizza le enterotossine stafilococciche, proteine altamente termostabili, solubili in acqua e resistenti a varie proteasi (tripsina, chimotripsina, renina, papaina). Le adesine promuovono la colonizzazione delle cellule dell'ospite, mentre le invasive (leucocidina, ialuronidasi e fosfolipasi) l'invasione dei tessuti. Sono anche presenti fattori di superficie (capsula, proteina A) che inibiscono la fagocitosi da parte dei macrofagi, altri che mascherano il determinante immunologico (proteina A, coagulasi) e tossine che danneggiano le membrane cellulari (emolisine, TSST1). Queste ultime sono super-antigeni poiché, legando i MHC II posti sulle APC, attivano la risposta dei linfociti T. La contaminazione può avvenire nell'allevamento, a causa di scarse condizioni igieniche o di salute

dell'animale e/dei lavoratori di filiera. Gli alimenti più coinvolti sono carne, pesce, lattici crudi, preparazioni artigianali e prodotti di pasticceria. È possibile modificare principalmente tre parametri per impedire la crescita dei batteri: una temperatura inferiore a 6°C o superiore a 48°C, un pH di 4.0 o un valore di acqua libera di 0.80. Per impedire la produzione di tossine, invece: una temperatura inferiore a 10°C o superiore a 45°C, un pH di 5.0 o un valore di acqua libera di 0.90.

## VIRUS

**REPLICAZIONE VIRALE.** Le glicoproteine virali si legano a specifici recettori, inducendo l'endocitosi del virus nella cellula. Nel citoplasma il virus si libera del capsido e sulla superficie del reticolo endoplasmatico rugoso il materiale genetico viene replicato e le proteine virali vengono sintetizzate. Le ultime fasi della replicazione consistono nell'assemblaggio, maturazione e liberazione dei virioni.

**NOROVIRUS.** L'infezione da Norovirus è autolimitante ma assai contagiosa, soprattutto in comunità ristrette, in quanto la dose infettante è di sole 10 particelle virali; viene trasmessa per via oro-fecale direttamente o attraverso acqua e alimenti crudi (molluschi e crostacei, pollame, preparazioni gastronomiche). Dopo un periodo di incubazione di circa 12-48 ore, si manifestano dolori addominali, nausea, vomito, mal di testa, febbre e diarrea. La terapia consiste in reidratazione e riposo. Il Norovirus resiste ad etere ed alcol etilici e al cloroformio, mentre può essere abbattuto con una concentrazione di cloro maggiore a 10mg/dL o mediante pastorizzazione (72°Cx15s/1min).

**HAV.** Il virus dell'epatite A, che presenta l'uomo come serbatoio naturale, dopo un periodo di incubazione di 10-50 giorni provoca sintomi quali vomito e diarrea sporadici, febbre e ittero. La terapia prevede farmaci antivirali accompagnati da reidratazione e riposo. Si osserva infiammazione degli epatociti e la dose infettante è di 100 particelle virali. Gli alimenti e l'acqua vengono contaminati con feci e urine umane. L'HAV resiste ad etere etilico e cloroformio, mentre può essere abbattuto da alcol etilico, una concentrazione di cloro maggiore a 10mg/dL o pastorizzazione (72°Cx15s/1min).

**HEV.** Il virus dell'epatite E vede in suini e roditori il proprio serbatoio naturale e, dopo un periodo di incubazione di 2-8 settimane, determina anoressia, febbre, dolori addominali, nausea, rash, artralgia, diarrea e complicanze neurologiche. L'infezione viene contrastata con terapia di supporto e talvolta trapianto del fegato. Si osserva infiammazione degli epatociti e la dose infettante è di 100 particelle virali. Gli alimenti e l'acqua vengono contaminati con feci e urine animali. L'HEV resiste ad etere ed alcol etilici e al cloroformio, mentre può essere abbattuto con una concentrazione di cloro maggiore a 10mg/dL o mediante pastorizzazione (72°Cx15s/1min).

## ENCEFALOPATIA SPONGIFORME BOVINA (BSE)

Le encefalopatie spongiformi sono malattie neurodegenerative ad esito fatale che colpiscono i mammiferi. Vengono così definite perché il tessuto cerebrale assume una forma spugnosa. Il periodo di incubazione varia tra i 5 e i 10 anni, dopodiché si osservano sintomi progressivi: apatia, perdita di peso, alterazioni comportamentali, incapacità di coordinare i movimenti, demenza, paresi, collasso e infine decesso. L'agente eziologico della malattia è un prione, ossia un isomero conformazionale di una glicoproteina normalmente espressa: nel caso della BSE, la PrP<sup>Sc</sup> è l'isomero patogeno della PrP<sup>C</sup> e viene internalizzata nei neuroni, inducendo l'isomerizzazione delle forme non patogene e la loro aggregazione in placche amiloidi alla periferia della cellula, che viene distrutta. Il cambiamento conformazionale è auto-indotto e determina un aumento della percentuale di  $\beta$ -foglietto nella struttura secondaria. A livello alimentare, è consigliato astenersi dal consumo di cervella, midollo, organi linfo-reticolari, occhi e intestino del bovino. La patologia viene diagnosticata mediante osservazione *post-mortem* del tessuto cerebrale o tramite biopsia tonsillare seguita da test immunologico. La vCJD è la variante umana derivante dalla BSE.

## MICOTOSSINE

**AFLETOSINE.** Le aflatoossine sono metaboliti secondari prodotti dai funghi del genere *Aspergillus*. Si tratta di agenti intercalanti in grado di alchilare le basi azotate del DNA della cellula ospite. Sono sintetizzate grazie ad una ventina di

enzimi che, partendo dal malonilCoA, formano un precursore polichetonico, alla cui estremità si ha la ciclizzazione in anelli benzenici e la successiva aggiunta di un acido grasso. Si distinguono in aflatoossine B (blu) e G (verde) in base all'emissione di luce in seguito ad esposizione di radiazioni UV. Gli alimenti maggiormente contaminati sono quelli ricchi in monosaccaridi (frutta), polisaccaridi (cereali) e lipidi (semi oleaginosi, frutta secca, spezie, caffè, cacao); la contaminazione in questo caso avviene in campo. Negli animali che si cibano dei vegetali ammuffiti, l'aflatoossina B<sub>1</sub> viene detossificata mediante idrossilazione a formare AFM<sub>1</sub>; di questa, una quota finisce nel sangue e, di conseguenza, anche nel latte. Dato che presenta una porzione idrofobica dominante, la sua concentrazione è maggiore nei formaggi che nei burri. Nell'uomo le aflatoossine possono determinare aflatossicosi acuta (vertigini, lesioni vascolari, edema, alterazioni immunitarie, lesioni ed insufficienza epatiche, coma) o cronica (danni al SN, cirrosi epatica o carcinoma di fegato, cistifellea e reni). Nei bovini ha effetti altrettanto drastici e più estesi. È possibile modificare principalmente tre parametri per impedire la crescita della muffa e delle tossine, rispettivamente: una temperatura inferiore a 5 e 10°C o superiore a 45 e 38°C, un pH di 3.0 e 4.0 o un valore di acqua libera di 0.78 e 0.83.

**FUSARIUM.** I funghi del genere *Fusarium* sono fitopatogeni ubiquitari che attaccano soprattutto i cereali causando marciume di organi sotterranei o alterazioni vascolari. Essi producono principalmente tre tossine: deossinivalenolo (epatotossico, carcinogenico), fumonisine (epatotossiche, nefrotossiche, neurotossiche, carcinogeniche) e zearalenone (estrogenico, epatotossico).

**PENICILLIUM.** I funghi del genere *Penicillium* sono muffe aerobie ubiquitarie, con preferenza per climi freddi o temperati ed elevata umidità, che attaccano i vegetali e gli insetti producendo principalmente quattro tossine: acido ciclopiazonico, ocratossina A, patulina e penitrem A. Gli alimenti maggiormente coinvolti sono cereali, frutta secca, spezie, caffè, cacao, vino passito, birra e carni.

## GHA – GOOD HYGIENIC PRACTICES

**Sezione I - Obiettivi.** Identificare i principi essenziali di igiene alimentare applicabili in filiera per assicurare la sicurezza e l'idoneità dell'alimento al consumo umano. Raccomandare un approccio HACCP per aumentare la *food safety*, suggerire come implementarlo ed istituire codici specifici per ogni filiera produttiva.

**Sezione II - Scopo, uso e definizione.** I governi possono considerare il contenuto di questi documenti e decidere, considerando le statistiche di popolazione, come incoraggiarne l'implementazione nel proprio Paese (programmi di educazione). Le aziende dovrebbero applicare le buone pratiche igieniche per proteggere i consumatori ed aumentarne la fiducia al consumo. Anche i consumatori devono svolgere il proprio ruolo seguendo le istruzioni e le raccomandazioni fornitegli. Vengono inoltre definiti i termini internazionali di riferimento per specifiche espressioni, in modo che siano riconoscibili.

**Sezione III - Produzione primaria.** La produzione primaria deve essere gestita con il fine di ridurre la probabilità di rischio per la sicurezza e l'idoneità dell'alimento anche negli stadi finali della filiera alimentare. Per fare ciò è necessario: evitare aree ambientali in cui sia presente una sostanza nociva che potrebbe infiltrarsi nella materia prima; monitorare i livelli di contaminanti e parassiti nella materia prima e lo stato di salute di animali e piante; eliminare in modo sicuro le sostanze di scarto; adottare misure per assicurarsi che l'alimento sia prodotto in condizioni igieniche appropriate.

**Sezione IV - Stabilimento: progettazione e struttura.** In base alla natura dell'operazione ed ai rischi ad essa associati, fondamenta, attrezzatura e strutture dovrebbero essere allocate, progettate e costruite in modo da: ridurre al minimo la contaminazione; permettere adeguate manutenzione, pulizia e disinfezione, soprattutto delle superfici di contatto; controllare i parametri ambientali (temperatura, umidità, luce); garantire protezione da infestazione di parassiti e un rifugio in caso di situazioni di emergenza; fornire accesso all'acqua potabile e dividere questa dal sistema di acqua non potabile, che può essere sfruttato in caso di incendio ad esempio.

**Sezione V - Controllo delle operazioni.** Per produrre alimenti sicuri ed idonei al consumo è necessario formulare requisiti per materie prime, composizione, processamento, distribuzione e utilizzo da parte del consumatore da perseguire durante la produzione e la manipolazione degli alimenti. Inoltre è bene progettare, implementare e monitorare i sistemi di controllo. Il controllo della temperatura è uno dei punti critici a cui porre maggiore

attenzione. Il *packaging* deve essere progettato in modo che protegga l'alimento senza alterarne le caratteristiche, sia facilmente pulibile e si alteri irrimediabilmente in caso di apertura.

**Sezione VI - Manutenzione e sanificazione.** Stabilire sistemi efficaci per manutenzione e pulizia adeguate e sistemi di monitoraggio di queste operazioni, controllare i parassiti e limitare gli sprechi.

**Sezione VII - Igiene personale.** Per abbassare le probabilità di contaminazione dell'alimento da parte di quelle persone che vengono a contatto diretto o indiretto con esso, è necessario che mantengano un appropriato grado di igiene personale e un comportamento adeguato, astenendosi da pratiche pericolose come il fumo; talvolta può essere richiesto l'utilizzo di dispositivi di protezione. L'individuo deve essere sospeso dal proprio incarico in caso di comparsa di certi sintomi, come diarrea e vomito.

**Sezione VIII - Trasporto.** Durante il trasporto è necessario adottare misure per proteggere l'alimento da eventuali fonti di contaminazione e danneggiamento che lo rendano inadeguato al consumo e provvedere ad un ambiente in cui la proliferazione di microrganismi dannosi e la produzione di tossine da parte di questi siano tenuti sotto controllo.

**Sezione IX - Informazioni sul prodotto e consapevolezza del consumatore.** I prodotti alimentari dovrebbero essere accompagnati da informazioni adeguate ed accessibili al personale della filiera produttiva, compreso il lotto di appartenenza per l'identificazione e la rimozione dal mercato in caso di necessità. Il consumatore dovrebbe avere una sufficiente conoscenza delle norme igieniche per poter comprendere l'importanza delle informazioni che accompagnano il prodotto e di conseguenza fare scelte appropriate nell'acquisto, conservazione e preparazione dello stesso. Le informazioni date a livello industriale e commerciale dovrebbero essere facilmente distinguibili da quelle destinate al consumatore.

**Sezione X - Addestramento.** Le persone coinvolte nelle operazioni di trasformazione alimentare che vengono a contatto diretto o indiretto con cibo e/o superfici devono essere addestrate ad un livello appropriato per il compito che devono eseguire.

For the purpose of this Code, the following expressions have the meaning stated:

**Cleaning** - the removal of soil, food residue, dirt, grease or other objectionable matter.

**Contaminant** - any biological or chemical agent, foreign matter, or other substances not intentionally added to food which may compromise food safety or suitability.

**Contamination** - the introduction or occurrence of a contaminant in food or food environment.

**Disinfection** - the reduction, by means of chemical agents and/or physical methods, of the number of micro-organisms in the environment, to a level that does not compromise food safety or suitability.

**Establishment** - any building or area in which food is handled and the surroundings under the control of the same management.

**Food hygiene** - all conditions and measures necessary to ensure the safety and suitability of food at all stages of the food chain.

**Hazard** - a biological, chemical or physical agent in, or condition of, food with the potential to cause an adverse health effect.

**Food handler** - any person who directly handles packaged or unpackaged food, food equipment and utensils, or food contact surfaces and is therefore expected to comply with food hygiene requirements

**Food safety** - assurance that food will not cause harm to the consumer when it is prepared and/or eaten according to its intended use.

**Food suitability** - assurance that food is acceptable for human consumption according to its intended use.

**Primary production** - those steps in the food chain up to and including, for example, harvesting, slaughter, milking, fishing.

## HACCP – HAZARD ANALYSIS and CRITICAL CONTROL POINTS

Il sistema HACCP identifica specifici rischi e misure per il controllo di questi per assicurare la sicurezza e l' idoneità dell' alimento. L' HACCP è quindi uno strumento che agisce sulla prevenzione, evitando di fare affidamento principalmente sui test a carico del prodotto finito. Le procedure HACCP sono basate su sette principi.

1. **Identificare e analizzare qualsiasi tipo di pericolo (analisi di rischio).** Tutti i potenziali rischi biologici, chimici o fisici devono essere identificati e classificati. Per fare ciò, bisogna considerare la probabilità dell' avvenimento del rischio e la gravità degli effetti collaterali che esso produce, la qualità e/o quantità dell' elemento di rischio e la sua capacità di resistere a processi di abbattimento. Bisogna poi applicare le misure di controllo per prevenire, eliminare o ridurre l' impatto o la possibile presentazione del pericolo fino a livelli accettabili. Le misure di controllo devono essere convalidate.
2. **Identificare i punti critici di controllo (CCP) ad uno o più step ai quali è essenziale prevenire, eliminare o ridurre a livelli accettabili qualsiasi rischio rilevante.** Questo passaggio richiede un rigido approccio logico, che può essere facilitato dall' utilizzo di un albero decisionale. L' identificazione dei CCP deve assicurare che siano designate e implementate appropriate misure di controllo. Se per un determinato passaggio non esistono misure di controllo, è necessario porre delle modifiche affinché ciò cambi.
3. **Stabilire i limiti critici dello specifico CCP che separino l' accettabilità e l' inaccettabilità di prevenzione, eliminazione o riduzione dei rischi identificati.** I limiti critici corrispondono ai valori estremi accettabili per la sicurezza del prodotto. Tali limiti possono essere superati solo in modo esiguo a livello di quantità e tempo.
4. **Stabilire ed implementare procedure di monitoraggio effettive ai vari CCP.** Le osservazioni e le misure devono essere in grado di individuare eventuali perdite di controllo ai CCP e fornire tali informazioni per tempo, così da applicare un' azione correttiva. Osservazioni e misure devono poter essere rilevate in modo costante. Le azioni correttive, laddove possibile, devono essere applicate prima che la deviazione si manifesti.
5. **Stabilire azioni correttive quando il monitoraggio indica che un CCP non è sotto controllo.** Le azioni correttive per ciascun CCP dovrebbero essere pianificate in anticipo dalla squadra HACCP, in modo che siano prese senza esitazioni quando il monitoraggio indica una deviazione dai limiti critici.
6. **Stabilire procedure da eseguire regolarmente per verificare che le misure delineate nei confronti del rischio siano efficaci.** La squadra HACCP deve specificare i metodi e i procedimenti da utilizzare per le azioni correttive. Si devono applicare attività analitiche sui campioni dei lotti e attività di ispezione, anche sul personale facente parte della produzione dell' alimento. La verifica dovrebbe essere svolta da qualcuno che non si occupi già del monitoraggio e dell' applicazione delle azioni correttive; questa persona può anche essere esterna. All' inizio del processo o in caso di cambiamenti, le attività di validazione dovrebbero essere esposte e presentare evidenze che ne sostengano l' efficienza.
7. **Creare una documentazione equivalente alla natura ed alla dimensione del business dell' alimento per dimostrare l' effettiva applicazione delle misure designate nei sei punti precedenti.** Questo passaggio è necessario per possedere una cronologia degli eventi, permettendo sia alla squadra HACCP di individuare eventuali problemi durante il processo, sia alle autorità competenti di verificare le procedure.

Prima di applicare questi passaggi, però, è necessario l' assemblamento di una squadra HACCP, la descrizione del prodotto e dell' utilizzo che se ne vuole fare. I prodotti tradizionali di una cultura, etichettati e protetti in quanto tali, possono andare in deroga a determinati criteri di igiene.

## RISK ANALYSIS

Consiste nello sviluppo di una struttura razionale dove le conoscenze sulla stima del rischio sono integrate con informazioni e considerazioni di tipo economico, sociale, culturale e ambientale, al fine di gestire e comunicare il rischio in decisioni politiche o di attuazione programmatica o di gestione delle emergenze.

1. **Risk assessment.** Stima o valutazione del rischio definibile come un metodo per la valutazione oggettiva del rischio alimentare nella quale certezze ed incertezze sono chiaramente presentate e considerate. Si articola

in quattro passaggi: identificazione del pericolo [descrizione del pericolo e valutazione della capacità di provocare un danno], effetto dose-risposta [quantità di sostanza che determina l'effetto negativo sull'ospite], stima dell'esposizione [determinazione della via di contatto, della quantità, della frequenza e della durata dell'esposizione all'agente eziologico] e caratterizzazione del rischio [descrizione della natura e della grandezza del rischio, tenendo conto di certezze ed incertezze]. Quantitativamente, il rischio può considerarsi come il risultato del prodotto tra la probabilità del danno [probabilità che il pericolo produca un danno al consumatore in seguito al consumo del prodotto] e la gravità del danno [gravità della patologia che il pericolo arreca al consumatore]; entrambe le variabili possono assumere un valore compreso tra 1 e 4. Questo passaggio è gestito da un team di esperti di diverse discipline, operatori e consulenti.

2. **Risk management.** Questo passaggio è affidato alle *stakeholders* (portatore di interesse) e a *decision makers*. Pianificazione del sistema, applicazione di tale sistema, monitoraggio e revisione, azioni correttive ulteriori se necessarie.
3. **Risk communication.** Questo passaggio è affidato alle *stakeholders* (portatore di interesse). Si tratta di un processo interattivo di informazione tra individui, gruppi ed istituzioni relative alla gestione del rischio, volto a migliorare la gestione del rischio.

## CRITERIO MICROBIOLOGICO

Si definisce criterio microbiologico lo strumento applicativo idoneo a distinguere tra accettabilità e inaccettabilità di una matrice alimentare da parte di autorità competenti e/o da operatori del settore. È la dichiarazione di conformità di un lotto produttivo. Il CM dovrebbe essere stabilito e applicato solo in caso di evidenze di un reale o potenziale pericolo per la salute del consumatore e quando la sua applicazione è praticabile e tecnicamente sostenibile applicando le GHP e HACCP.

1. **Norma/standard.** Criterio obbligatorio stabilito da regolamenti, leggi o ordinanze.
  - Criterio di sicurezza alimentare: definisce l'accettabilità di un prodotto o di una partita di prodotti alimentare applicabile ai prodotti immessi sul mercato.
  - Criterio di igiene di processo: definisce il funzionamento accettabile del processo di produzione.
2. **Valore guida.** Criterio raccomandato da una autorità di varia natura in quel settore.
3. **Specificata da capitolato.** Criterio stabilito da un accordo commerciale tra un acquirente e un fornitore.

Categoria alimentare	Stabilisce il tipo di alimento da sottoporre ad analisi
Microrganismi ed eventuali metaboliti	
Piano di campionamento n = numero di unità campionarie c = numero di unità campionarie marginalmente accettabili (valore compreso tra m e M)	Definire il campione rappresentativo del lotto, il numero e il peso delle unità campionarie, il livello di accettabilità del lotto e la frequenza di campionamento
Limiti m = valore massimo di concentrazione al di sotto del quale il lotto è accettabile M = valore massimo di concentrazione al di sopra del quale il lotto è inaccettabile	Stabilire i valori limite, le condizioni generali di consumazione dell'alimento, il livello di tolleranza, fattibilità e sostenibilità economica, punto del processo produttivo in cui applicare il criterio
Metodo di analisi di riferimento	Elaborato da organizzazioni internazionali (ISO). Eventuali metodi alternativi devono essere certificati. Il metodo va selezionato per accuratezza, precisione, rapidità e costo. È necessario stabilire la modalità di prelievo.
Fase a cui si applica il criterio	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità per criteri di sicurezza alimentare. Durante e alla fine del processo di lavorazione per criteri di igiene di processo.

## MICROORGANISMI INDICATORI E ALTERANTI

Microrganismi la cui concentrazione, o i cui prodotti metabolici, indicano lo stato igienico mantenuto in produzione/distribuzione oppure lo stato di alterazione di un alimento. Si distinguono tre categorie.

- **Batteri indicatori di igiene di processo.** Mesofili aerobi, enterobatteri, stafilococchi coagulasi positivi (*S. aureus*, *B. cereus*)
- **Batteri di contaminazione fecale.** *E. coli*, clostridi solfito riduttori, enterococchi.
- **Batteri e miceti alteranti indicatori di shelf-life.** *Pseudomonadaceae*, batteri acidificanti e sporigeni, lieviti, miceti.

**Coltura starter:** coltura di batteri o miceti addizionata alla materia prima o ad un semilavorato, in una determinata fase del processo, per far partire e/o controllare un'attività microbica necessaria alla preparazione o maturazione del prodotto alimentare. L'industria latte-casearia è quella che utilizza maggiormente colture starter.

- **Sieroinnesti e lattoinnesti naturali:** coltura costituita da più ceppi della stesse specie e da specie differenti realizzata lasciando sviluppare in siero o latte la microflora.
- **Single o multiple strains:** coltura costituita da uno o più ceppi della stessa specie, isolati, selezionati in laboratorio in base a caratteristiche tecnologiche, preparati singolarmente in fermentatori e una volta raggiunte concentrazioni elevate miscelati insieme.
- **Mixed strains:** a differenza dei precedenti, vengono co-coltivati i vari ceppi.

## MICROORGANISMI UTILI e STARTERS

**Microrganismi utili.** Microrganismi la cui concentrazione e le cui attività metaboliche sono utili per la preparazione di un alimento (pro-tecnologici) o di un integratore (probiotici), oppure indispensabili per mantenere lo stato di salute del consumatore.

**Microrganismi starter.** Coltura di batteri o miceti che viene addizionata alla materia prima o ad un semilavorato, in una determinata fase del processo, per far partire e/o controllare un'attività microbica necessaria alla preparazione o alla maturazione del prodotto alimentare. L'analisi per l'idoneità all'uso nel settore alimentare deve determinare: antibiotico resistenza, produzione di tossine, fattori di virulenza e ammine biogene, modificazione e stabilità genetiche.

- **Sieroinnesti e lattoinnesti naturali.** Coltura costituita da più ceppi della stessa specie e da più specie differenti realizzata lasciando sviluppare in siero la microflora derivante da una lavorazione precedente o in latte la microflora presente nel latte crudo dopo termizzazione.
- **Single o multiple strains.** Coltura costituita da uno o più ceppi isolati e selezionati in laboratorio in base alle loro attività e successivamente preparati singolarmente in concentrazioni elevate e miscelati.
- **Mixed strains.** Coltura costituita da più ceppi della stessa specie isolati e selezionati in laboratorio in base alle loro attività e successivamente preparati singolarmente in concentrazioni elevate.

**Colture liquide** Sono gli innesti naturali o le colture "madre" degli innesti selezionati o gli innesti selezionati di spore fungine, preparati in siero o in latte o in permeato o in brodi culturali complessi

**Colture concentrate congelate** Sono innesti selezionati preparati ad elevata concentrazione (UFC/g > 10<sup>11</sup>). Congelati in N<sub>2</sub> liquido. Mantenuti a T < -30°C. Usati per inoculo diretto.

**Colture liofilizzate** Sono innesti selezionati preparati ad elevata concentrazione (UFC/g > 10<sup>11</sup>). Liofilizzati. Sono stabili a T ambiente. Usati per inoculo diretto o indiretto.

**Colture essiccate** Sono innesti selezionati o mixed strains preparati ad elevata concentrazione (UFC/g > 10<sup>10</sup>). Essiccati con sistema Spray-Dry. Sono stabili a T ambiente. Usati per inoculo indiretto.

**Ruolo ed impiego degli eso-polisaccaridi.** Protezione naturale contro essiccazione, difesa contro attività del SI, adesione superficiale (biofilm), trattenimento di enzimi e cattura di ioni metallici, aumento della viscosità, trattenimento dell'umidità, gelificazione, produzione di destrano (industria farmaceutica/chimica).

## MICROBIAL CHALLENGE TEST

L'MCT è un test per valutare sicurezza e qualità di un prodotto alimentare sfruttando un inoculo di microrganismi di interesse e osservando il loro comportamento nel prodotto. Viene utilizzato per convalidare l'operazione di un processo o la shelf-life di un prodotto. La pianificazione necessita di un disegno sperimentale (DOE) che consideri tutti i fattori da studiare (selezione ceppi, livello contaminazione, formulazione e preparazione matrice alimentare, ecc.) e che risponda ai requisiti dell'analisi statistica. Nella formulazione alimentare da saggiare è bene inoculare una miscela di almeno tre ceppi della stessa specie e utilizzare: ceppi che presentino attività patogena solo in ambienti controllabili, ceppi surrogati o ceppi isolati in precedenza dallo stesso tipo di prodotto; i ceppi possono essere recuperati da collezioni microbiche internazionali. È opportuno sfruttare tecniche molecolari (RFLP con PFGE, REP-PRC, Ribotyping) per discriminare i ceppi tra loro e dal microbiota di fondo. Il livello di contaminazione da approntare è di 10<sup>2-4</sup> UFC/g nello studio della shelf-life e di 10<sup>6-8</sup> nella validazione del processo; è opportuno applicare due livelli di contaminazione e valutare anche campioni di controllo senza contaminazione. Le variabili che caratterizzano il prodotto finito o il processo per intero devono essere replicate in modo quanto più realistico, così come la modalità di contaminazione che potrebbe verificarsi; è bene protrarre il monitoraggio del prodotto oltre la durata prevista per determinare gli effetti che avrebbe sul consumatore. L'analisi è costante nel tempo ed è desiderabile avere dati da almeno tre repliche. La distribuzione delle cellule microbiche in una matrice alimentare segue la curva di frequenza di Poisson. Per l'analisi dei dati microbiologici bisogna utilizzare la media geometrica: i dati grezzi vengono trasformati in logaritmi e di questi viene fatta media aritmetica, dopodiché la base del logaritmo utilizzato (10) viene elevata al valore precedentemente ottenuto per avere la concentrazione in UFC/g. I risultati possono essere utilizzati nello sviluppo di modelli predittivi.

## METODI DI NUMERAZIONE

**Metodi diretti:** conta delle colonie su piastra, osservazione microscopica, citofluorimetria a flusso.

**Metodi indiretti:** densità ottica, impedenza, bioluminescenza, PCR quantitativa.

## MICROBIOLOGIA PREDITTIVA

La microbiologia predittiva sfrutta modelli matematici che mettono in relazione parametri biologici e fisico-chimici per prevedere la sicurezza e la qualità microbiologica di un alimento in condizioni reali. I modelli deterministici sono costruiti su basi teoriche e permettono di comprendere le leggi che governano il fenomeno di interesse, mentre quelli empirici descrivono semplicemente le relazioni matematiche esistenti tra dati sperimentali e variabili considerate. La maggior parte dei modelli comunque descrive una cinetica di crescita o morte di una popolazione microbica.

**Modelli deterministici - 1<sup>a</sup> legge di Bigelow.** Ad una temperatura letale, la velocità di distruzione dei microrganismi è proporzionale al numero di cellule viventi o spore presenti nell'istante considerato; il suo valore segue una cinetica di primo ordine se l'inattivazione è casuale, la popolazione ed il mezzo di trattamento sono omogenei, cellule o spore sono in stato planctonico. Il tempo di riduzione decimale varia in base a fattori intrinseci (specie, ceppo, stato fisiologico cellula) ed estrinseci (acqua libera, pH, contenuto di grassi nel mezzo):

**Modelli empirici - funzione di Gompertz.** Funzione sigmoidea che descrive la crescita come più lenta all'inizio ed alla fine di un determinato periodo di tempo; l'asintoto del valore di destra viene avvicinato molto più gradualmente dalla curva rispetto a quello di sinistra.