



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE,
PRODUZIONI E SALUTE

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN
SICUREZZA IGIENICO-SANITARIA DEGLI ALIMENTI

TESI DI LAUREA

VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE
MICROBIOLOGICHE DI PRODOTTI DI IV
GAMMA

RELATORE: CH.MO PROF. PAOLO CATELLANI

CO-RELATORE: DOTT. RENZO MIONI

LAUREANDA: GIORGIA CARRARETTO

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

Al futuro di noi giovani...

INDICE

| | |
|--|----------------|
| Riassunto | Pag. 5 |
| 1. Scopo della tesi | Pag. 7 |
| 2. Introduzione | Pag. 8 |
| 3. Alimenti di IV gamma | Pag. 10 |
| 3.1 Aspetti storici della tecnologia di IV gamma | Pag. 10 |
| 3.2 Diffusione del prodotto nel Mondo e Italia | Pag. 14 |
| 3.3 Processo produttivo e descrizione della filiera | Pag. 17 |
| 3.4 Normativa di riferimento | Pag. 21 |
| 4. Aspetti igienico-sanitari nella lavorazione dei prodotti di IV gamma | Pag. 25 |
| 4.1 Pericoli presenti nella materia prima | Pag. 25 |
| 4.2 Sistema HACCP e individuazione e gestione dei punti critici nella lavorazione dei vegetali di IV gamma | Pag. 31 |
| 5. Malattie alimentari causate dal consumo di alimenti di IV gamma | Pag. 34 |
| 5.1 Aspetti epidemiologici delle malattie alimentari | Pag. 34 |
| 5.2 Rischi igienico-sanitari per il consumo di vegetali di IV gamma | Pag. 36 |
| 5.3 Episodi di malattie alimentari causati dal consumo di prodotti di IV gamma | Pag. 39 |
| 6. Materiali e metodi | Pag. 42 |
| 6.1 Procedure analitiche | Pag. 44 |
| 6.1.1 Ricerca di <i>Salmonella</i> a 37°C | Pag. 45 |
| 6.1.2 Ricerca di <i>Listeria monocytogenes</i> | Pag. 48 |
| 6.1.3 Ricerca di <i>Yersinia enterocolitica</i> | Pag. 50 |
| 6.1.4 Ricerca di <i>Escherichia coli</i> O157 | Pag. 53 |

| | |
|--|----------------|
| 6.1.5 Ricerca di <i>Campylobacter</i> spp. | Pag. 54 |
| 6.2 Polymerase Chain Reactions (PCR Real-Time) | Pag.56 |
| 7. Risultati | Pag. 58 |
| 8. Discussione | Pag. 62 |
| 9. Conclusione | Pag. 67 |
| 10. Bibliografia | Pag. 69 |

SUMMARY

The minimally processed food are product already cleaned, washed, packed and ready to use. In spite of their high cost, a great percentage are bought by people. They spread first in the USA, and then in Europe and in the North of Italy where most enterprises are located. Companies which produce ready-to-use vegetables (salad) must respect and apply the proper GMP and HACCP critical points throughout the manufacturing process. The aim is to get a final product of good microbiological quality. Actually, they must obey the limits fixed by the EC Regulation n.2073/2005 implemented on 1st January, 2006. For all process hygiene they must refer to EC Regulation n.852/2004. At the end, about packaging they must refer to law n.77 of 13rd May 2011. This law of national level discipline the Ready-To-Eat product's preparation, packaging and distribution. The analysis of this elaboration was made from 2011 October to 2012 January by IZSVe in Legnaro. The matrix taken for testing was simple salad, mixed salad, carrots, spinach etc., taken directly by the companies and immediately analyzed. The microorganism researched was: *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Salmonella*. The results are satisfying, and the microorganism found are only *Yersinia enterocolitica* and *Listeria* spp., but in a restricted number of samples. In the discussion the data have been compared with other bibliographical works and it is possible to see that the results were similar. At the end we understand that prime quality material with good hygiene of production and the continuous monitoring of microorganism allows the market to give a quality product.

RIASSUNTO

I prodotti di IV gamma sono alimenti già puliti, lavati, confezionati e pronti al consumo. Il loro successo li porta a percentuali d'acquisto molto elevate nonostante i prezzi aumentati. Si sono diffusi prima in America successivamente in Europa e poi in Italia, in particolare al Nord dove è presente il maggior numero di aziende. Le aziende produttrici di prodotti di IV gamma devono rispettare ed applicare durante tutto il processo produttivo le GMP e i punti critici descritti nel manuale HACCP. Lo scopo è di ottenere un prodotto finito che sia ottimale dal punto di vista microbiologico. Esse, infatti, devono rispettare i limiti imposti dal Reg CE n. 2073/2005, recepito il 1 Gennaio 2006. E per l'igiene in tutta la filiera devono fare riferimento al Reg CE n. 852/2004 "sull'igiene dei prodotti alimentari". Infine riguardo al confezionamento devono riferirsi alla legge del 13 Maggio 2011, n.77, che disciplina a livello nazionale, la preparazione, il confezionamento, e la distribuzione dei prodotti ortofrutticoli di IV gamma. Le analisi studiate in questa tesi sono state svolte dal mese di Ottobre 2011 al mese di Gennaio 2012, per opera dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Le matrici in esame sono insalate semplici, mix di insalate, carote, spinaci, radicchio ecc, già confezionate e pronte per essere consumate, prelevate direttamente dall'azienda e analizzate immediatamente. I microrganismi ricercati sono stati: *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*. I risultati ottenuti sono soddisfacenti, gli unici microrganismi patogeni trovati sono stati *Y. enterocolitica* e *Listeria spp.*, ma in un numero abbastanza limitato di campioni. Nella discussione questi dati sono stati confrontati con i risultati di altre ricerche ed è emerso che i risultati per certi aspetti sono simili. Si capisce infine che una materia prima di qualità unita alla buona igiene di produzione e al continuo monitoraggio dai microrganismi presenti, permette di distribuire sul mercato un prodotto di qualità.

1. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della tesi è quello di valutare l'effettiva sicurezza igienico-sanitaria di alcuni vegetali di IV gamma, basandomi e valutando i dati forniti da una ricerca sostenuta dal laboratorio di Microbiologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, sede di Legnaro. L'analisi è stata sostenuta, dal mese di Ottobre 2011 al mese di Gennaio 2012, su 110 campioni di insalate, di IV gamma, lavate e non lavate nel percorso di produzione. Durante questo periodo ho sostenuto lo stage proprio in questo laboratorio, così che mi è stato possibile partecipare attivamente alle attività di ricerca sui suddetti campioni.

2. INTRODUZIONE

Le insalate di quarta gamma, o anche chiamate *ready-to-eat*, sono poco caloriche, adatte ad un regime alimentare sano e a basso contenuto di grassi, e ai ritmi frenetici della vita moderna. Ecco perché hanno conosciuto in pochi anni una larghissima diffusione principalmente nel nord Italia.

Con il termine “quarta gamma” vengono indicate preparazioni di vegetali freschi, mondati delle parti non utilizzabili, tagliati, lavati, asciugati, imballati in buste o vaschette di plastica e venduti in banco refrigerato. L'alto grado di umidità e l'atmosfera modificata sono indotte dal *packaging* con plastica impermeabile o con cassette di polipropilene. Infatti, l'utilizzo di biossido di carbonio e il mantenimento del prodotto a basse temperature, sono necessari per rallentare il metabolismo e la respirazione cellulare, così da preservare la freschezza e il valore nutrizionale per al massimo una settimana dalla preparazione. Questa atmosfera modificata e un canale di coltivazione-processo-distribuzione integrato permette il commercio di vegetali facilmente deperibili come il “Lattughino” raccolta ad uno stadio primario di maturazione. La denominazione, di origine francese (IV gamme), indica indirettamente il tipo di trasformazione, in termini di comparsa commerciale rispetto ad altre categorie di prodotti agroalimentari: non lavorati (prima), conserve pastorizzate (seconda), surgelati (terza). In ambito anglosassone sono usati i termini *fresh-cut* e, più in generale, *minimally processed*, che indicano direttamente il tipo di trasformazione. Una denominazione italiana frequente è ‘freschi pronti al consumo’ o ‘freschi-pronti’ (Http 1).

Con un alto rapporto peso/superficie e un pH verso la neutralità, le insalate ospitano un'ampia varietà di microrganismi, che contribuiscono alla naturale degradazione degli organi vegetali staccati dalla pianta. Patogeni, come *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, possono contaminare il prodotto durante la coltivazione e il processo di produzione. La contaminazione con enteropatogeni può avvenire in vari modi: con l'uso di rifiuti organici e fertilizzanti, con l'utilizzo di acqua di irrigazione contaminata da materiale

fecale, con la contaminazione diretta da parte di insetti e animali selvatici e con la scarsa igiene nei processi di raccolta e produzione.

I microrganismi e gli enteropatogeni trovano protezione dai disinfettanti e dai lavaggi nelle irregolarità che si possono trovare sulla superficie della foglia o sui danni nel tessuto vegetale.

Le basse temperature e l'atmosfera modificata non sono molto efficienti contro lo sviluppo dei batteri patogeni psicrotrofi, come *Listeria*.

Infatti, contenere la presenza di microrganismi è importante per cercare di preservare la qualità di questi prodotti; permettendo la presenza di batteri si contribuisce a creare un danno al tessuto vegetale e alla crescita di un *biofilm* sulla superficie di esso (Caponigro *et al.*, 2010).

Per ridurre il pericolo dei patogeni, i paesi europei hanno stabilito dei criteri microbiologici (Regolamento Ce 2073/2005) che i prodotti non devono superare per essere idonei al consumo umano. Questi criteri includono limiti per *E. coli* come indicatore di contaminazione fecale e di qualità igienica del processo di produzione.

La sanità, infatti, è requisito principale di qualità dei prodotti alimentari. Il Regolamento Ce 852/2004 ha sancito disposizioni per armonizzare le norme generali di igiene dei prodotti alimentari, che riguardano tutte le fasi del processo produttivo e distributivo, raccomandando anche la diffusione di informazioni in campo igienico, per far crescere la professionalità dei produttori alimentari e la capacità di valutazione e controllo dei consumatori (Http1).

L'obbiettivo di questo studio è quindi quello di fornire quante più informazioni possibili sulla produzione e sulla qualità e sicurezza microbiologica delle insalate di IV gamma prodotte in Veneto, prendendo in considerazione i coliformi, gli sporigeni e i patogeni come *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ed *Escherichia coli* O157.

3. ALIMENTI DI IV GAMMA

3.1 ASPETTI STORICI DELLA TECNOLOGIA DI IV GAMMA

La comparsa dei prodotti di IV gamma (Http 2), si è verificata per la prima volta in U.S.A. negli anni '60 e da allora la loro presenza nei mercati d'oltreoceano è divenuta sempre più consistente anche se si sono verificati dei momenti di contrazione delle vendite. Gli anni '80 hanno rappresentato un periodo di grande importanza nella storia del consumo della IV gamma perché questi prodotti assumono chiaramente tutti i caratteri di praticità d'uso e salubrità. Negli U.S.A. l'innovazione nel marketing e nella tecnologia applicata al settore ortofrutticolo è stata dovuta alla necessità di rinnovamento del reparto stesso che ha portato così all'affermazione dei cosiddetti *ready-to-eat*. Da tale momento in poi, negli U.S.A. le vendite dei prodotti di IV gamma hanno mostrato costantemente degli incrementi positivi, sino a giungere nel 2003 un volume d'affari di oltre 12 miliardi di dollari che rappresentano circa il 13% del totale delle vendite del comparto ortofrutticolo.

Il grande successo raggiunto è imputabile all'esistenza di una congiuntura favorevole, sia scientifica, sia economica nella filiera statunitense. In merito alla prima un ruolo primario è stato assunto dall'allungamento della durata di conservazione che attualmente varia dai 10 ai 16 gg per gli ortaggi e dai 3-5gg per la frutta. Questi risultati sono riconducibili al ridotto grado di umidità dell'ortofrutticolo alla raccolta e al minor effetto condensa sulla vaschetta di conservazione per l'interruzione dell'irrigazione almeno 2 giorni prima della raccolta.

Per quanto riguarda il mercato europeo, il primo timido tentativo di introduzione di questi prodotti risale agli anni '70, ma il segmento della IV gamma è nato in Francia nel 1981 e da qui si è diffuso in tutta Europa affermandosi soprattutto nel Regno Unito, Germania e Svizzera e Italia.

In Francia per tutto il decennio degli anni '80 e per i primi '90, il settore ha ricevuto il contributo di una grande quantità di produttori ortofrutticoli, tenuto

conto della domanda e del modello di consumo contingenti. Negli anni a seguire, a discapito delle previsioni il mercato della IV gamma è entrato in una fase di stagnazione, per la forte contrazione del rapporto qualità prezzo. Ciascuna azienda, per garantire la propria affermazione sul mercato ha attuato la strategia di una drastica riduzione dei prezzi a discapito della qualità, che è invece una prerogativa dei vegetali *lightly-processed*.

Di conseguenza, le scelte del consumatore si sono nuovamente indirizzate verso il comparto tradizionale dell'ortofrutta fresco. Il diminuire della domanda ha inevitabilmente comportato la scomparsa degli operatori sino a giungere nel 2002 ad uno sparuto gruppo di aziende produttrici (solo tre coprivano oltre l'80% della domanda), ad oggi però il mercato della minima lavorazione è in netta crescita.

Stime recenti definiscono un'incidenza media della IV gamma pari all'8% del totale del mercato ortofrutticolo francese e inglese, rispettivamente 350 e 500 milioni di euro.

Anche in Italia la IV gamma rappresenta oggi circa il 7% del volume di affari della vendite di ortofrutta, ossia 375 milioni di euro, contro i 5389 del totale comparto ortofrutta (dati riferiti al 2004).

In Italia i prodotti della IV gamma sono comparsi cinque anni dopo l'esordio francese. Soltanto a partire dalla metà degli anni '80 però si è registrata in Italia l'ascesa delle famiglie in cui i due componenti, marito e moglie, lavorano, che ha sollecitato il cambiamento della cultura alimentare legata al consumo del fresco sfuso.

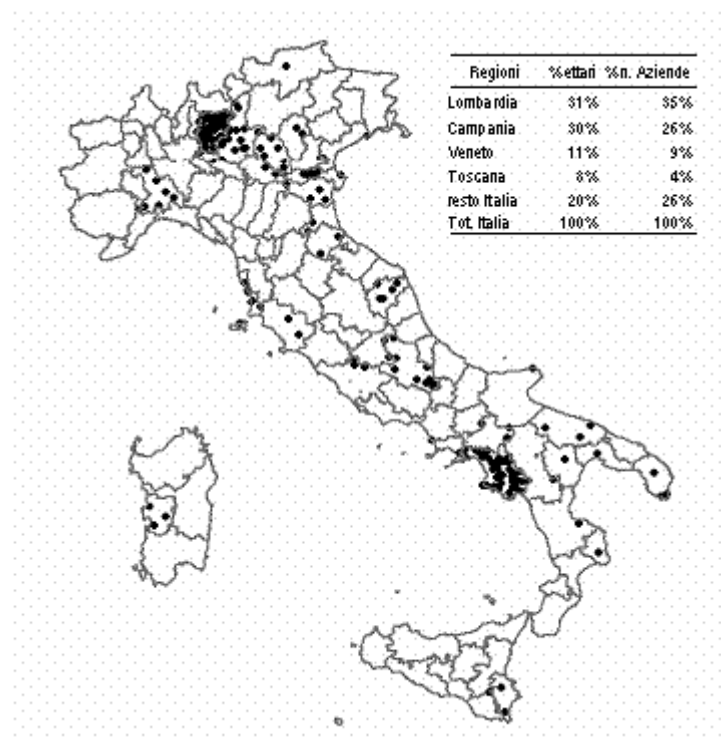
Purtroppo la politica di vendita dei primi anni ha comportato un rallentamento e conseguente diminuzione del mercato. Infatti i primi prodotti erano frutto degli eccessi produttivi del comparto tradizionale, che spesso erano contraddistinti da ridotta qualità. C'era quindi un forte danneggiamento a livello di immagine del prodotto. Ne è risultato una stasi produttiva del mercato italiano fino a metà degli anni '90. Questo ne ha risultato una forte perdita di innovazione e logistica rispetto agli altri Paesi europei.

Solo di recente sono state attuate delle politiche di mercato atte alla diffusione di un prodotto non più di nicchia ma di consumo di massa.

Secondo indagini di mercato risalenti al 1994 e poi 1999 e 2001 la concentrazione delle realtà produttive si ha nel Settentrione del paese ed in particolare a nord-ovest.

Emerge che la localizzazione delle industrie trasformative coincide con l'area di maggior domanda di IV gamma, che nel nostro paese riguarda soprattutto Lombardia e Piemonte dove è più diffuso lo stile di vita delle grandi città. Nonostante le industrie nazionali della IV gamma si collochino essenzialmente al Nord, e da sole riescano a soddisfare il 70-75% dell'intero mercato nazionale, in realtà assolvono il solo ruolo di trasformazione. Infatti, la produzione della materia prima, per la maggior parte dei prodotti di IV gamma, è di provenienza meridionale, mentre la sua lavorazione avviene in altre regioni. Da ciò ne deriva un quadro saliente che permette di motivare alcuni dei limiti sinora manifestati dalla IV gamma in Italia.

Figura 1- Distribuzione delle aziende di IV gamma in Italia.



In primo luogo, questa condizione comporta problemi al condizionamento in termini di difficoltà di approvvigionamento continuo della materia prima. Questi ultimi hanno come immediata conseguenza le cosiddette “rotture di stock”, la riduzione della qualità e il deterioramento dell’immagine del prodotto. In seconda analisi, la separazione fra il sito di produzione e quello di lavorazione induce ad inevitabili costi di trasporto che incidono notevolmente sul prezzo di vendita del prodotto, a cui si aggiunge il possibile decadimento qualitativo del tessuto vegetale a causa del subentrare di fenomeni ossidativi qualora non venisse garantita la continuità della “catena del freddo”. Riguardo le problematiche sopra esposte alcuni operatori per ovviare a queste carenze hanno tentato di valorizzare la qualità della loro *commodity* ricorrendo a:

1. Forme di cooperazione aziendale per una più ampia produzione: ad esempio l’associazione Aop-apol a cui appartengono circa 350 agricoltori distribuiti su tutto il territorio nazionale, ma la concentrazione si ha nelle province di Bergamo, Brescia e Salerno. Le prime assicurano la distribuzione al centro-nord, mentre l’ultima al centro-sud, in modo tale da garantire la freschezza del prodotto. Infatti il disciplinare di produzione degli associati prevede la raccolta della lattuga la sera e la consegna agli stabilimenti sopra indicati fra le 5 e le 8 del mattino ([http 2](#));
2. Certificazione di rintracciabilità del prodotto, o mediante un codice alfanumerico da inserire nel sito dell’azienda produttrice, o con l’indicazione del numero di lotto che deve obbligatoriamente essere indicato nell’etichetta;
3. Certificazioni volontarie (ISO 9001:2000) e obbligatorie (HACCP), per conferire al consumatore sicurezza igienica e nutrizionale del prodotto. La “nuova frontiera” riguardo le certificazioni sono le certificazioni internazionali Brc (*British retail consortium*) e Ifs (*International food standard*) che rappresentano una sorta di HACCP applicato, che contempla norme igieniche nelle fasi di lavorazione e dello stabilimento ([http 2](#)) .

3.2 DIFFUSIONE DEL PRODOTTO NEL MONDO E IN ITALIA

Negli ultimi anni, i prodotti ortofrutticoli di IV gamma hanno dimostrato un alto tasso di gradimento in controtendenza al costante calo dei consumi di frutta e verdura fresca, questo dimostra che le famiglie di tutto il mondo favoriscono e necessitano dell'innovazione e della quantità di servizi che questo tipo di prodotto offre. Infatti gli ultimi anni hanno fatto registrare tassi di crescita sconosciuti alla maggior parte dei comparti dell'alimentare: secondo dati ACNielsen nel periodo compreso tra il 2002 e il 2007 la crescita media annua si è attestata sopra il 20%, per poi scendere leggermente l'anno successivo, fino a cambiare rotta solo nel 2008, anno in cui, rispetto al 2007, si è avuta una diminuzione del 2% in volume e del 4% in valore. Nel 2008 l'intero mercato si è attestato attorno alle 90.000 tonnellate, con un giro d'affari di circa 700 milioni di euro. Tale performance, che sembra essere confermata anche nel 2009, posiziona l'Italia al secondo posto dopo la Gran Bretagna, nella graduatoria dei principali mercati europei ([http 3](#)).

Attualmente non ci sono informazioni ufficiali sulle superfici investite alla produzione di prodotti per la IV gamma in Italia, quindi bisogna fare riferimento alle organizzazioni di produttori per avere le stime. In base alle indicazioni fornite dall' Aop UnoLombardia (principale società consortile di Op di IV gamma), la superficie utilizzata ricopre 6500 ettari, prevalentemente in serra, con una media sulla superficie di 5-6 cicli l'anno. Come precedentemente affermato, la regione dove è maggiormente concentrata la produzione è la Lombardia, con il 31% di ettari, a cui segue la Campania (30%), il Veneto (11%), la Toscana (8%). Le province più produttive sono Brescia e Bergamo, seguite da Salerno.

Il mercato della IV gamma, è rappresentato per l'86% dalle insalate. Tra queste la porzione maggiore è coperta dalle miste croccanti (34%), mentre le confezioni "mono"-qualità come lattughino, valeriana e rucola ricoprono assieme il 35%.

Quindi in virtù di ciò che è stato affermato sopra la domanda si concentra prevalentemente a Nord-Ovest con il 41% delle vendite in valore, mentre è poco

sviluppata al sud con il 12%. Tuttavia negli ultimi anni nelle regioni meridionali si sta registrando un aumento della quota in quantità e valore.

Circa l'86% delle vendite dei prodotti di IV gamma nel 2009 sono passate attraverso iper e supermercati e il restante dagli *hard-discount* e dai liberi servizi. Si assiste ad un aumento progressivo dell'importanza degli ipermercati e degli *hard-discount* a scapito dei supermercati che dal 2005 ad oggi sono passati dal 58% al 49% delle vendite. Solo dal 2008 i discount hanno cominciato ad affermarsi in questo settore, e proprio in quest'anno si è verificata un'inversione di tendenza dell'intero mercato. In questo canale distributivo si ritrovano i prezzi di vendita minori, infatti i prodotti di IV gamma vengono acquistati a 5,61€/kg, mentre presso i supermercati i prezzi medi raggiungono gli 8,16 €/kg. Si deve notare però anche la dinamica dei dati rispetto a cinque anni prima, che evidenzia una contrazione più accentuata dei prezzi nel libero servizio che negli ipermercati. Stanno conquistando il mercato le *private label*: in base ai dati Nielsen circa il 60% della IV gamma viene venduta con il marchio commerciale e tale quota è in costante aumento (Casati e Baldi, 2010).

Paesi come Gran Bretagna e Stati Uniti hanno fatto passi da gigante nello sviluppo di questi prodotti freschi: a presentare esperienze concrete del mercato inglese e americano sono state *Kip Winter-Cox*, direttore marketing della *Bakkavor*, azienda leader a livello mondiale per la trasformazione dei vegetali, e *Beth Padera*, in rappresentanza dello statunitense *Perishables Group*.

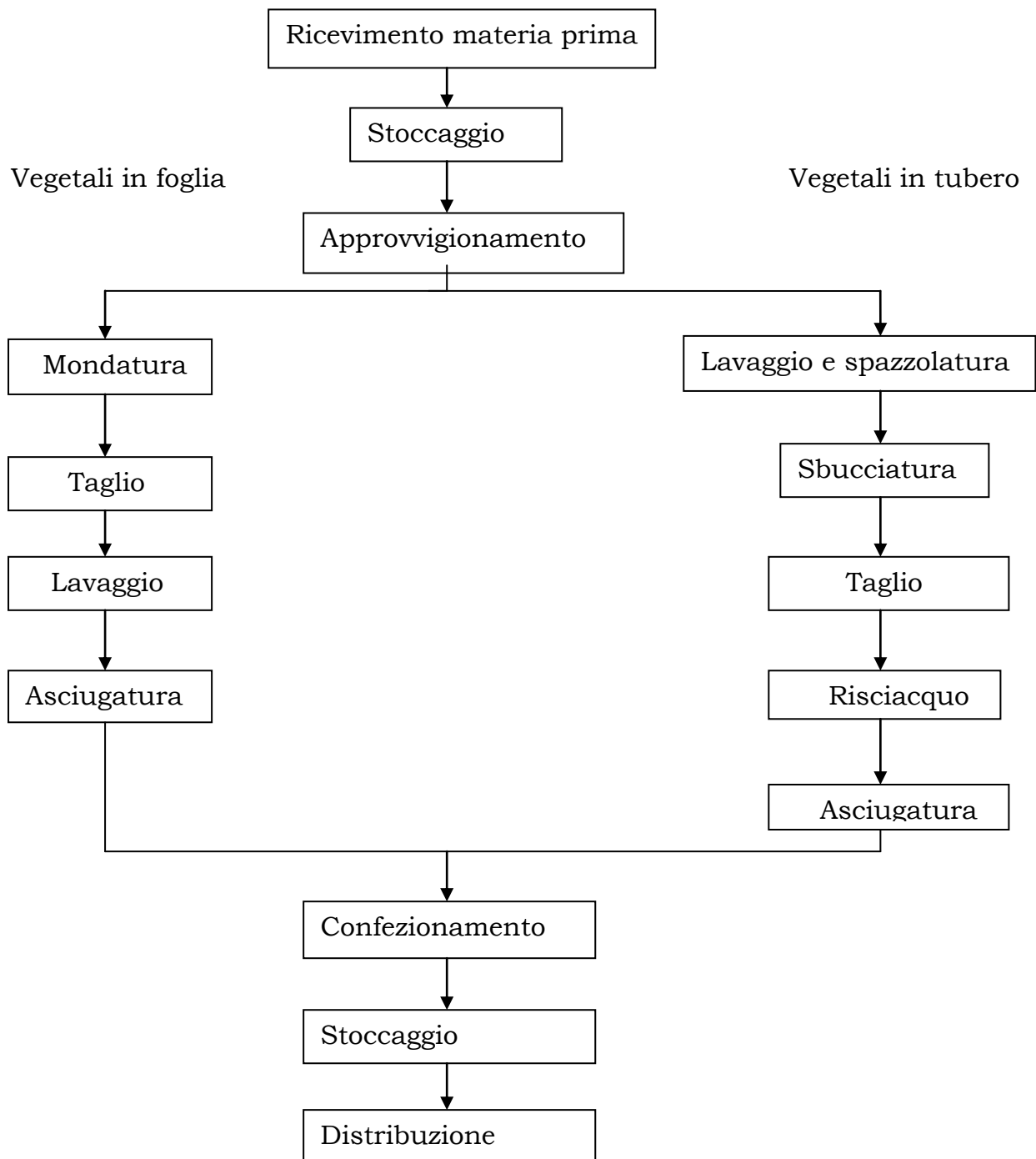
Kip Winter-Cox ha illustrato la situazione attuale in Gran Bretagna, dove i prodotti di IV gamma hanno una fortissima penetrazione nel mercato alimentare (per un valore totale di 4 miliardi di euro al consumo), tanto da essere ormai vicini alla maturità e pronti ad ulteriori evoluzioni.

Le quantità di prodotti di IV gamma consumate nel nuovo e nel vecchio continente sono estremamente diverse. Se un Americano in media consuma circa 30 kg di prodotti di IV gamma, la media europea è di circa 3 kg pro capite all'anno. Tuttavia le differenze sono molto sostanziali in Europa: il Regno Unito raggiunge i 12 kg pro capite all'anno, la Francia consuma 6 kg pro capite

all'anno, l'Italia circa 4 kg pro capite all'anno. Altri pesi dove la IV gamma è ben conosciuta ma i consumi risultano molto minori sono Belgio, Olanda e Germania. I pesi dell'Europa dell'Est si stanno sviluppando molto in questo segmento, un aspetto che non viene sottovalutato dalle principali aziende internazionali (Http 4) .

3.3 PROCESSO PRODUTTIVO E DESCRIZIONE DELLA FILIERA

Tabella n.1. Diagramma di flusso del processo produttivo



La fisiologia dei prodotti di IV gamma è riconducibile alla fisiologia dei prodotti ortofrutticoli sottoposti a stress: le operazioni di pulitura, cernita, lavaggio, pelatura e differenti tipi di taglio e sminuzzatura sono operazioni che inducono

stress da ferite e ammaccature. Per tali ragioni i prodotti di IV gamma sono generalmente più deperibili dei corrispondenti integri, sono esposti a contaminazioni biotiche e a disidratazione. Nella conservazione di questi prodotti diventa fondamentale la temperatura: mantenendo la catena del freddo si riducono le proliferazioni dei patogeni e si rallentano i processi biologici.

Solo i vegetali della migliore qualità, in termini di condizione fisiologica, aspetto e integrità, e qualità microbiologica possono reggere allo stress indotto dalla preparazione, in modo da risultare sicuri ed appetibili fino al termine della durata commerciale. L'occorrenza di tossinfezioni alimentari attribuibili al consumo di questi prodotti è molto bassa in relazione alla loro diffusione, grazie agli sforzi del sistema produttivo verso l'implementazione di sistemi di qualità (Http 5).

La respirazione dei prodotti tagliati è più intensa di quelli integri e si verifica già pochi minuti dopo la lavorazione e tanto più intensa è la respirazione, tanto più rapida è la degradazione. Dal momento che l'attività respiratoria è legata ad enzimi termo-dipendenti, questa, aumenta all'aumentare della temperatura. Per questo processo necessita di zuccheri come substrato, e la sua intensità è correlata alla perdita di qualità nutrizionale globale del prodotto. Per la insalate di IV gamma la presenza di tagli causa la maggiore produzione di etilene che accelera i processi di invecchiamento. Questi prodotti subiscono anche modificazioni di biochimiche come il cambiamento di colore delle superfici tagliate (ossidazione dei fenoli con produzione di sostanze brune non gradite).

Molte delle fasi del processo di lavorazione di prodotti di IV gamma risultano meccanizzate, ma per alcune di esse è ancora necessaria la presenza di mano d'opera specializzata.

Per ottenere un prodotto finito di qualità, come detto prima, la fase cruciale è rappresentata dalla selezione di un prodotto di prima scelta.

Gli ortaggi, dopo breve stoccaggio in cella a 0-2°C che non supera mai i due giorni per la specie più resistenti, vengono selezionati manualmente; i ceppi delle lattughe vengono tagliati in 2 su taglieri e attraverso un'accurata

selezione i ceppi meno buoni e le foglie ingiallite sono allontanati. I ceppi di lattuga poi, o gli ortaggi a foglia in genere, giungono in una macchina taglierina mediante un nastro trasportatore e qui vengono tagliate le foglie, praticando tagli quanto più uniformi possibile; le dimensioni finali delle foglie possono essere regolate dall'operatore. Le lame devono essere ben affilate e di giusto spessore, in acciaio inox e ben sanificate con ipoclorito all'1%. È importante evitare le contaminazioni crociate.

Le foglie più piccole vengono eliminate automaticamente, mentre le altre, spostandosi sempre su un nastro trasportatore, giungono in vasche di lavaggio con dimensioni variabili (in genere di 3x1,5 metri). Nelle vasche è presente acqua clorata che garantisce l'asportazione della terra e di piccoli insetti eventualmente presenti, perché questi ultimi galleggiano ed è possibile allontanarli con una griglia a maglie strette posta lungo il percorso che l'acqua segue. L'acqua deve essere potabile e la sua temperatura deve essere inferiore ai 5°C, la quantità di acqua utilizzata è di circa 5-10 l/kg di prodotto prima del taglio e 3-5 l/kg di prodotto dopo il taglio (Http 5). In seguito le foglie subiscono un secondo lavaggio in un'altra vasca nella quale giungono sempre attraverso un nastro trasportatore, questo risciacquo è necessario per eliminare le ultime tracce di cloro presenti.

Figura 2-Macchina di lavaggio per insalate di IV gamma



Poi spostandosi su un altro nastro le foglie vengono cosparse di acido citrico, o in alcuni casi di acido ascorbico, che fuoriesce da un apposito ugello. Gli acidi organici rallentano nelle foglie i processi di imbrunimento e delle parti tagliate che renderebbero non commercializzabile il prodotto anche dopo breve tempo. L'acido ascorbico previene gli imbrunimenti sia perché abbassa il pH ma anche perché ha proprietà riducente, infatti riduce la quantità di ossigeno necessaria all'ossidazione. In alternativa si usano acido citrico uniti a soluzioni zuccherine che aiutano il mantenimento del colore e la compattezza.

Tramite un altro nastro le foglie giungono in un cestello di centrifuga con lo scopo di allontanare l'acqua di lavaggio e asciugare quanto più possibile il prodotto, in modo da ridurre la possibilità di sviluppo di muffe dopo l'imbustamento. Il funzionamento della centrifuga si basa sulla differenza di densità tra gli ortaggi e l'acqua, che durante la centrifugazione fuoriesce dal cestello attraverso opportune aperture presenti nelle pareti.

Da qui la foglie possono seguire due vie diverse: o in una pesatrice a canali vibranti o un operatore può introdurle in una pesatrice elettronica, nel primo caso il prodotto pesato giunge in una imbustatrice dalla quale fuoriesce il prodotto imbustato, pronto al consumo; Nel secondo caso, dopo la pesatura elettronica il prodotto viene posto in una vaschetta insieme ad altri ortaggi, al fine di realizzare la "insalate miste". In quest'ultimo caso le vaschette preparate manualmente vengono indirizzate in una impacchettatrice flow-pack e ad una etichettatrice che appone l'etichetta con tutte le informazioni inerenti al giorno di produzione, la modalità di conservazione, la data di scadenza e gli ingredienti utilizzati.

Figura 3- Prodotti di IV gamma.



Per prolungare la conservazione e la qualità di questi ortaggi si è sviluppato il confezionamento in atmosfera modificata, o MAP. Questa tecnologia consiste nell'inserimento all'interno della confezione di miscele di gas (CO_2/O_2 , O_2/N_2) in porzioni diverse da quelle presenti nell'atmosfera e nei materiali plastici usati per il packaging. L'uso delle atmosfere protettiva non va considerato come un mezzo di risanamento o di miglioramento qualitativo di un prodotto scadente, ma piuttosto come un'operazione tecnologica di supporto che solo unitamente ad altri interventi può raggiungere gli effetti desiderati (http 5). L'alto tenore di CO_2 si è mostrato utile per le insalate; I polimeri utilizzati infatti hanno permeabilità diversa nei confronti di ossigeno, azoto e anidride carbonica e grazie a questo favoriscono all'interno della confezione il mantenimento di un'atmosfera povera di ossigeno (Http 6).

3.4 NORMATIVA DI RIFERIMENTO

La sanità è requisito principale di qualità dei prodotti alimentari. Per garantirla sono stati promulgati leggi e regolamenti in riferimento ai prodotti di IV gamma.

Il Reg. *CE n. 2073/2005*, che definisce un criterio microbiologico in base al quale si definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all'assenza, alla presenza o al numero di microrganismi e/o in base alla quantità delle relative tossine/metaboliti, per unità di massa, volume, area o partita. Al riguardo per microrganismi si intendono i batteri, i virus, i lieviti, le muffe, le alghe, i protozoi parassiti, gli elminti parassiti microscopici, le loro tossine e i loro metaboliti. Lo stesso regolamento definisce come conformità ai criteri microbiologici l'ottenimento di risultati soddisfacenti o accettabili (specificati nell'allegato I, successivamente modificato dal Reg. *CE 1441/2007*) nei controlli volti ad accertare la conformità ai valori fissati per i criteri mediante il prelievo di campioni, l'effettuazione di analisi e l'attuazione di misure correttive, conformemente alla legislazione in materia di prodotti alimentari e alle istruzioni dell'autorità competente.

Un criterio microbiologico indica che un determinato microrganismo o gruppo di microrganismi, o tossina microbica deve essere assente, o presente al massimo in un determinato numero di unità campionarie o presente a un livello non superiore a un limite prefissato in una quantità specificata di alimenti o di ingredienti. I criteri microbiologici vengono stabiliti da organizzazioni internazionali, governi, aziende o enti. In genere, i governi si avvalgono dell'assistenza di organizzazioni scientifiche internazionali come la *International Commission for Microbiological Specification for Food (ICMSF)*.

Il campionamento deve essere fatto casualmente, così da rappresentare in modo uniforme una partita di prodotto, e lo schema di campionamento è definito in base alla frequenza dei microrganismi, per poter rifiutare con una buona probabilità partite che superano i limiti previsti.

Di seguito sono specificati criteri microbiologici specifici di sicurezza alimentare e di igiene di processo per gli alimenti vegetali freschi pronti.

Come criteri di sicurezza alimentare:

1. per *Listeria monocytogenes*: deve essere assente in 25g di prodotto per prodotti che devono ancora uscire dal sistema di controllo diretto del produttore;
2. per *Salmonella*: deve essere assente in 25 g di prodotto per i prodotti non scaduti.

Come criteri di igiene di processo, che valutano la qualità dei processi produttivi:

3. per *Escherichia coli* i limiti sono da un minimo (m) di 100 a un massimo (M) di 1000 UFC/g durante il processo di lavorazione. Sono definite tre categorie: idoneo se 5 unità su 5 sono sotto il limite inferiore, accettabile se 2 unità su 5 sono tra m ed M, e inaccettabile se meno di 2 unità su 5 sono sotto il limite inferiore e più di una è sopra il limite superiore.

Il *Reg CE n. 852/2004* sull'igiene dei prodotti alimentari, che sostituisce la direttiva *93/43/CEE* sull'igiene dei prodotti alimentari al fine di attuare una politica globale ed integrata applicabile a tutti i prodotti alimentari, dalla fattoria fino al punto di vendita al consumatore. Questo regolamento mira a garantire l'igiene dei prodotti alimentari in tutte le fasi del processo di

produzione, dalla produzione primaria fino alla vendita al consumatore finale. Esso non concerne le questioni relative alla nutrizione, né quelle riguardanti la composizione e la qualità dei prodotti alimentari. Il regolamento si applica alle imprese del settore alimentare e non alla produzione primaria e alla preparazione di alimenti per uso domestico privato.

Tutti gli operatori del settore alimentare (OSA) controllano che tutte le fasi di cui sono responsabili, dalla produzione primaria fino alla vendita o alla messa a disposizione di prodotti alimentari al consumatore finale, si svolgano in maniera igienica. Gli OSA che svolgono attività di produzione primaria e certe attività connesse devono attenersi alle disposizioni generali d'igiene. Possono essere concesse deroghe per quanto riguarda le piccole imprese, se ciò non compromette gli obiettivi del regolamento. Gli OSA che svolgono attività diverse da quella di produzione primaria devono attenersi alle disposizioni generali d'igiene di cui all'allegato II. Tale allegato specifica le disposizioni riguardanti:

- i locali, compresi i siti esterni;
- le condizioni di trasporto;
- le attrezzature;
- i rifiuti alimentari;
- il rifornimento idrico;
- l'igiene personale delle persone che entrano in contatto con i prodotti alimentari;
- i prodotti alimentari stessi;
- il confezionamento e l'imballaggio;
- il trattamento termico che permette di trasformare certi prodotti alimentari;
- la formazione degli operatori del settore.

Gli OSA, inoltre, applicano i principi del sistema HACCP (analisi dei pericoli e punti critici di controllo) introdotto dal *Codex Alimentarius* (raccolta di norme alimentari internazionali elaborata nel quadro dei lavori dell'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura).

Tali principi prescrivono un certo numero di requisiti da soddisfare nel corso del ciclo di produzione, di trasformazione e di distribuzione al fine di

consentire, grazie a un'analisi dei pericoli, l'individuazione dei punti critici il cui controllo che risulta indispensabile per garantire la sicurezza alimentare.

Gli OSA collaborano con le autorità competenti, fornendo, in particolare, indicazioni su ogni stabilimento posto sotto il loro controllo e informando di ogni cambiamento della situazione (ad esempio della chiusura di uno stabilimento).

Quando la legislazione nazionale o comunitaria lo prescrive, le imprese del settore alimentare devono essere riconosciute dall'autorità competente e non possono operare senza tale autorizzazione.

È necessario che gli operatori del settore alimentare dispongano di sistemi e di procedure che permettono la rintracciabilità degli ingredienti e dei prodotti alimentari e, se del caso, dei prodotti utilizzati per la produzione degli alimenti. Inoltre, se un OSA constata che un prodotto alimentare comporta un rischio grave per la salute, deve ritirarlo immediatamente dal mercato, segnalandolo all'autorità competente e ai consumatori.

L'applicazione da parte degli OSA dei principi HACCP non sostituisce i controlli ufficiali effettuati dalle autorità competenti. Gli operatori sono tenuti in particolare a collaborare con le autorità competenti, conformemente alle disposizioni della normativa comunitaria o, in sua mancanza, nazionale.

Infine, la *Legge 13 Maggio 2011, n.77*, che disciplina a livello nazionale, la preparazione, il confezionamento, e la distribuzione dei prodotti ortofrutticoli di IV gamma. Sostiene che questi prodotti possono essere confezionati singolarmente o in miscela, in contenitori di peso e dimensioni differenti. È consentita l'eventuale aggiunta in quantità percentualmente limitata di ingredienti di origine vegetale non freschi o secchi.

Si stanno attendendo le pubblicazioni nella Gazzetta Ufficiale dei criteri chimico-fisici e igienico-sanitari del ciclo produttivo, del confezionamento, così da individuare le misure da introdurre progressivamente al fine di utilizzare imballaggi eco-compatibili secondo i criteri fissati dalla normativa comunitaria e dalle norme tecniche di settore, della conservazione e della distribuzione dei prodotti di IV gamma e i requisiti quantitativi minimi.

4. ASPETTI IGIENICO-SANITARI NELLA LAVORAZIONE DEI PRODOTTI DI IV GAMMA

4.1 I PERICOLI PRESENTI NELLA MATERIA PRIMA

I pericoli che si possono riscontrare nella materia prima dei prodotti di IV gamma, sono per lo più legati alle condizioni di coltivazione, in quanto su questi prodotti “*minimally processed*” non è possibile eliminare del tutto la carica microbica pur mantenendo integro il prodotto.

Sono infatti la localizzazione e la modalità di coltivazione che condizionano il prodotto sia sulla pianta che dopo la raccolta. Zone sfavorevoli non consentono di raggiungere caratteristiche di sviluppo e organolettiche ottimali nel prodotto, e per di più favoriscono la suscettibilità della coltura a fisiopatologie, attacchi di patogeni e parassiti, aumentando così, per la necessità di protezione da questi, i rischi di residui chimici di sintesi nel prodotto.

Inoltre, la localizzazione può essere fonte di eccessive impurità fisiche, chimiche e microbiologiche. Residui di metalli pesanti possono accumularsi in zone esposte al traffico automobilistico, reflui di allevamenti animali e altre fonti di inquinamento. Dalla prossimità di aziende zootecniche può dipendere una carica troppo elevata di microrganismi potenzialmente patogeni per l'uomo. Le deiezioni animali costituiscono una fonte di tali microrganismi, quindi non si dovrebbero utilizzare per la IV gamma vegetali coltivati in terreni trattati con concimi di origine animale. In genere, più alta è la carica microbica iniziale, più breve è la *shelf-life* del prodotto.

Un altro serbatoio per la contaminazione da microrganismi può essere l'acqua usata per l'irrigazione, infatti il rischio diventa maggiore quando si usano sistemi di irrigazione per aspersione. La qualità delle acque di falda non è costante (http 7), perché le fonti superficiali e quelle sotterranee possono essere esposte a contaminazioni temporanee per percolamenti di acque provenienti da zone inquinate.

Infine, è necessario controllare ed impedire l'accesso di animali selvatici alle riserve d'acqua che con il loro passaggio e le loro deiezioni possono portare parassiti e microrganismi dannosi al prodotto e all'uomo (V. Caponigro, F. Piro, 2010).

I principali microrganismi che si possono ritrovare nei prodotti di IV gamma sono i coliformi, gli sporigeni e i patogeni, in particolare *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* e *Yersinia enterocolitica*.

4.1.1 I COLIFORMI ¹

Nel gruppo dei coliformi totali vengono compresi microrganismi che fanno parte della famiglia Enterobacteriaceae. L'appartenenza a questa famiglia da parte di generi differenti, più che sulle caratteristiche sistematiche dei diversi microrganismi, si è basata storicamente sul metodo utilizzato per il loro rilevamento che sfrutta la loro capacità di fermentare il lattosio con produzione di gas e acido alla temperatura di 35°-37°C in 48 ore. I coliformi totali sono batteri a forma di bastoncino, Gram negativi, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni, e alcuni di questi sono dotati di pili e flagelli. Sono considerati, insieme ai coliformi fecali e agli streptococchi, classici indicatori di contaminazione nelle acque. Pur essendo presenti nel materiale fecale di origine umana con una densità media di 10⁹ UFC/g, sono ubiquitari. Proprio a causa della loro costante presenza nell'ambiente, la loro validità come indicatori è stata più volte messa in dubbio. Le più recenti indicazioni, in fase comunque di ulteriore evoluzione, tendono a distinguere i microrganismi appartenenti al gruppo in due principali categorie che, in base alle specie, e non più al genere, differenziano coliformi di origine fecale e coliformi di origine acquatica e tellurica, naturalmente presenti nelle acque al di là di qualsiasi contaminazione. La prima categoria, ben conosciuta, è quella dei coliformi di riconosciuta origine fecale che comprende alcune specie dei generi *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, presenti nel materiale fecale dell'uomo e degli animali a sangue caldo e in acque e suoli contaminati; infatti pur essendo

¹ Microbiologia Jerome J. Perry *et al.* 2004. Zanichelli

già presenti nel nostro intestino, se questi microrganismi venissero ingeriti, potrebbero causare serie patologie. La seconda categoria corrisponde a specie che, al contrario, sono largamente distribuite nell'ambiente, dove possono anche moltiplicarsi, colonizzando suolo, acqua e vegetazione.

Nelle acque reflue grezze le loro concentrazioni possono raggiungere valori compresi tra 10^7 - 10^9 UFC per 100 ml di campione (Manuali e Linee Guida 29/2003-metodi analitici per le acque APAT-IRSA/CNR).

4.1.2 GLI SPORIGENI²

Vengono raggruppati sotto questo nome tutti quei batteri che sono in grado di produrre un'endospora. Questa è una struttura molto particolare, prodotta da pochi generi, i due principali sono gli aerobi o anaerobi facoltativi del genere *Bacillus* e gli anaerobi obbligati del genere *Clostridium*.

L'endospora è una spora, o stadio di quiescenza tipica dei batteri, che si forma all'interno della cellula. La spora dormiente permette al batterio di sopravvivere a lunghi periodi di essiccazione e di elevata temperatura. Rispetto ad altri batteri, questi sono più resistenti non solo alla siccità e al calore ma anche ai raggi ultravioletti e alla disinfezione.

I batteri formanti endospora, hanno due fasi di crescita, la crescita vegetativa, che è la normale fase di crescita e riproduzione, e la sporulazione. I batteri sporigeni si trovano prevalentemente nei suoli, nei sedimenti acquatici e nei fanghi.

Il genere *Bacillus* contiene sia batteri aerobi che anaerobi facoltativi. Le tante specie di questo genere producono catalasi, il che spiega la loro sopravvivenza in presenza di ossigeno. Le varie specie di questo genere sono classificate in base alla loro morfologia cellulare, usando in particolare la forma delle endospore e la loro localizzazione. Le specie più conosciute sono: *B. subtilis* aerobio obbligato piccolo, *B. cereus* piuttosto grande ed è tra i più comuni batteri del suolo, *B. anthracis* che è l'agente casuale dell'antrace in uomini e animali, e a differenza di *B. cereus* non è mobile.

² Tratto dal medesimo libro sopra indicato.

Il genere *Clostridium* invece contiene solo batteri anaerobi, tra i quali alcune specie ambientali importanti e patogeni per l'uomo. Le specie di *Clostridium* sono raggruppate in alcuni sottogruppi principali a seconda delle loro capacità fermentative. Alcuni fermentanti gli aminoacidi sono causa di malattia, e fra questi troviamo *C. tetani*, agente eziologico del tetano, e *C. botulinum*, responsabile del botulismo. *C. botulinum* è un altro batterio patogeno del suolo. La tossina botulinica è un'esotossina proteica che viene liberata dal batterio durante la crescita. Questa tossina compromette il rilascio di acetilcolina dalle giunzioni dei nervi motori, causando così la paralisi di tutti i muscoli.

4.1.3 I PATOGENI³

Questi microrganismi sono chiamati patogeni perché se sono presenti negli alimenti che noi introduciamo con la dieta provocano malattie, infezioni e tossinfezioni. Il livello del danno che deriva da un'infezione dipende dalla patogenicità dell'invasore e dalla relativa resistenza dell'ospite.

Ciascun patogeno infatti è caratterizzato da: infettività, che è la capacità di penetrare attecchire e moltiplicarsi nell'ospite, patogenicità, che è la capacità di un microrganismo di causare un danno, carica infettante, cioè il numero minimo di patogeni necessario per dare inizio all'infezione, e infine, contagiosità, che si valuta calcolando quanti sani si infettano in presenza di un malato (Kramer e Cantoni 2011).

I patogeni che interessano maggiormente in quanto considerati patogeni alimentari per la loro possibile presenza negli alimenti sono *Campylobacter*, *Escherichia coli* O:157, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Yersinia enterocolitica*.

Campylobacter è un batterio microaerofilo (2-10% di CO₂ E 3-5% di O₂) con forma ricurva ad "S" o spiralato, mobile tramite uno o due flagelli polari, Gram negativo, fa parte dei *Proteobacteria*. È l'agente eziologico di una malattia diarroica acuta detta *campylobacteriosi*. Fa parte della microflora normale del

³ Tratto dal medesimo libro sopra indicato

tratto intestinale degli animali selvatici e domestici. Producono citotossine, sono enteroinvasivi, ed è sufficiente una piccola carica infettante per provocare gastroenterite con sangue nelle feci e febbre. La trasmissione all'uomo avviene per via oro-fecale, attraverso l'ingestione di cibo e acque contaminate, grazie alla sua morfologia spiraliforme e la presenza di flagelli, riesce a muoversi attraverso il muco e aderire, grazie alle adesine poste sui flagelli, alle cellule epiteliali intestinali, penetra poi negli enterociti e forma dei vacuoli. A questo punto l'organismo reagisce all'invasione e alla produzione di enterotossine attivando le cellule di difesa immunitaria .

Escherichia coli è un microrganismo a forma di bastoncello, anaerobio facoltativo, non sporigeno, Gram negativo, che cresce alla temperatura di 44,5 °C, è residente nell'apparato digerente di uomo e animali a sangue caldo. Esistono però ceppi che provocano una malattia diarroica, riscontrata prevalentemente i soggetti che viaggiano, è infatti chiamata "diarrea del viaggiatore". È possibile contrarre questa patologia a causa dell'ingestione di cibi o acqua contaminate, come per *Campylobacter*, ed è infatti considerato un indicatore di contaminazione fecale. I ceppi patogeni di *E. coli* possiedono fattori di virulenza trasportati dai plasmidi, uno di questi è l'antigene di superficie K che permette l'attacco e la penetrazione degli enterociti. Quindi, aderiscono alla mucosa intestinale attraverso pili e fimbrie che producono un enterotossina e scatenano la malattia.

Lysteria monocitogenes è un bastoncello tozzo, Gram positivo, non sporigeno, anaerobio facoltativo mobile a 28 °C per la presenza di flagelli peritrichi (da 1 a 5), catalasi positivo ma ossidasi negativo. Il microrganismo cresce in un *range* di temperatura molto largo (tra i + 3 °C e i 45 °C) con un optimum tra i 30 °C e i 38 °C. Esso si mantiene vitale anche a 0 °C e fino a temperature prossime a quelle usate per la pastorizzazione. È un patogeno soprattutto degli animali e viene trasmesso all'uomo tramite l'ingestione di cibi e bevande contaminate. possiede un lipopolisaccaride complesso sulla superficie, e questo una volta entrato nell'enterocita, e lisato il vacuolo con il quale era penetrato all'interno

della cellula, svolge la stessa funzione della tossina di un batterio Gram-negativo. Può infettare donne gravide e attraversare la barriera placentare ed infettare il feto.

Salmonella è un bacillo Gram negativo, asporigeno, aerobio facoltativo. Fermenta il glucosio, producendo gas (acido solfidrico), riduce i nitrati. La maggior parte non fermenta il lattosio. Possedendo flagelli peritrichi, sono tutte mobili. Nel tratto intestinale degli animali e degli uccelli possono essere presenti specie di salmonelle. La fonte di contaminazione del cibo sono le persone che maneggiano alimenti, come anche i portatori asintomatici, e data l'ampia distribuzione delle salmonelle praticamente quasi tutti gli alimenti sono a rischio di contaminazione. Una fonte di contaminazione possono essere anche le mani contaminate maneggiando animali infetti, ma anche l'acqua inquinata da rifiuti animali o umani. Uno dei fattori di invasività più interessanti è il TTSS, un complesso apparato multi proteico comune a molti Gram-negativi, che consente di esportare nella cellula ospite proteina effettrici che facilitano il superamento da parte del batterio della barriera intestinale e lo proteggono dall'azione dei macrofagi. Una volta superata la barriera intestinale, *Salmonella* libera le endotossine che causano l'alterazione enzimatica cellulare. I sintomi di salmonellosi sono cefalee, crampi addominali e diarrea.

Yersinia enterocolitica è una specie di batterio coccobacillo Gram-negativo, che provoca una zoonosi sia nell'uomo che in alcune altre specie animali quali gatti, maiali e alcuni uccelli. È l'agente eziologico dell'enterocolite nell'uomo. Può essere isolato nelle acque di pozzo e nelle acque lacustri. Come per molte delle malattie precedentemente menzionate anch'essa si trasmette per via oro-fecale. può essere veicolato tramite prodotti infetto congelati o refrigerati perché si sviluppa bene a 4 °C. Questo batterio attacca ed invade le cellule epiteliali intestinali, e la sintomatologia è causata da febbre, diarrea e dolori addominali.

4.2 SISTEMA HACCP E INDIVIDUAZIONE E GESTIONE DEI PUNTI CRITICI NELLA LAVORAZIONE DEI VEGETALI DI IV GAMMA

Il metodo HACCP è un sistema di analisi dei pericoli e contenimento dei rischi collegati nell'ambito dei processi produttivi alimentari.

Per quanto riguarda le imprese agricole che esercitano attività di trasformazione di prodotti, è basato sull'indicazione di pericoli che rappresentano un rischio per la salute del consumatore per la gravità degli effetti provocati. Questi pericoli sono identificati in specifici punti critici detti di "controllo" nell'ambito del processo produttivo. Nella sigla HACCP sono impliciti due elementi essenziali.

Il primo elemento è che il sistema riguarda i rischi gravi per la salute del consumatore. Viene fatta una selezione in relazione alla rilevanza intrinseca del pericolo ed alla frequenza stimata dell'evento dannoso, cioè alla sua probabilità.

Il secondo elemento interessante è l'aggettivo "CRITICAL" riferito a "CONTROL POINT". Il metodo suggerisce di attuare soltanto i sistemi di prevenzione efficaci in maniera decisiva. Il controllo deve essere fatto individuando un fattore di rischio in una fase del processo produttivo mettendo in atto una procedura che ne permetta il controllo e la prevenzione. L'insieme dei vari punti critici di controllo e, quindi, delle procedure adottate dal titolare dell'impresa agricola per prevenire l'insorgenza di rischi per il consumatore costituisce, quindi, la parte fondamentale del Manuale di Autocontrollo.

Comunque, occorre procedere ad una periodica verifica dell'efficacia delle attività preventive e di controllo per avere la certezza che sia stato fatto tutto il possibile per ottenere un prodotto igienicamente sicuro. Il risultato positivo ottenuto non può prescindere dalla verifica del sistema messo in atto, che deve avere lo scopo di accertare periodicamente l'effettivo ottenimento di prodotti con rischio accettabile.

Laddove possibile si prevede il ricorso a strumenti di misura semplici ed economici, adottando metodi di controllo visivo standardizzato (sulle materie prime o secondarie, sugli impianti/macchinari, sull'ambiente e il personale).

Il sistema di autocontrollo deve, infine, essere corretto ogni qualvolta vengano apportate modifiche al processo di lavorazione capaci di influire sugli aspetti igienici del prodotto. Quindi, il sistema stesso, il manuale e tutte le procedure sono destinate ad una continua evoluzione e ad un miglioramento.

I principi su cui si basa l'elaborazione di un piano HACCP, secondo quanto sancito dal Regolamento Ce n. 852/2004, sono 7:

1. Identificare ogni pericolo da prevenire, eliminare o ridurre
2. Identificare i punti di controllo critici (*Critical Control Points* - CCP) nelle fasi in cui è possibile prevenire, eliminare o ridurre un rischio
3. Stabilire, per questi punti di controllo critici, i limiti critici che differenziano l'accettabilità dalla inaccettabilità
4. Stabilire e applicare procedure di sorveglianza efficaci nei punti di controllo critici
5. Stabilire azioni correttive se un punto critico non risulta sotto controllo (superamento dei limiti critici stabiliti)
6. Stabilire le procedure da applicare regolarmente per verificare l'effettivo funzionamento delle misure adottate
7. Predisporre documenti e registrazioni adeguati alla natura e alle dimensioni dell'impresa alimentare.

I punti critici nella filiera produttiva sono molti, ma solo grazie alla loro identificazione e alla loro gestione è possibile limitare al minimo la presenza di microrganismi nei prodotti di IV gamma.

Le acque utilizzate per il lavaggio e la pulitura dei vegetali, è necessario che siano esclusivamente potabili, che non sia venuta a contatto con reflui o fonti contaminanti.

Deve avvenire una attenta asciugatura del prodotto perché non si sviluppi nella confezione umidità che possa favorire lo sviluppo di microrganismi.

Le buone pratiche di igiene devono essere rispettate da tutto il personale coinvolto nelle operazioni sul prodotto, anche da quelli che non lo toccano direttamente, come operatori di macchine, camionisti, visitatori. Per assicurarsi che il personale operante in azienda in modo stabile o saltuario

conosca bene le regole a cui attenersi, a seconda dei compiti e delle responsabilità, è opportuno istruirlo esplicitamente.

Nello specifico, i punti di controllo nel diagramma di flusso operativo dei vegetali IV gamma si ritrovano nel (http 11):

- Ricevimento delle materie prime. Rischio: microbiologico e chimico. Azione preventiva: controllo delle materie prime e rispetto dei capitolati;
- Stoccaggio. Rischio: moltiplicazione microbica. Azione preventiva: manutenzione e pulizia delle celle. Monitoraggio: controllo della temperatura e dello stato igienico dell'ambiente;
- Mondatura. Rischio: moltiplicazione microbica. Azione preventiva: manutenzione e pulizia celle. Monitoraggio: controllo dello stato igienico dell'ambiente e del personale;
- Taglio. Rischio: moltiplicazione e contaminazione microbica. Azione preventiva: pulizia delle superfici e controllo degli utensili. Monitoraggio: controllo del filo dei coltelli e delle superfici di lavoro;
- Lavaggio. Rischio: acqua contaminata. Azione preventiva: frequente cambio d'acqua. Monitoraggio: controllo della temperatura e dello stato igienico dell'acqua;
- Asciugatura. Rischio: moltiplicazione microbica. Azione preventiva: ottimizzazione delle operazioni. Monitoraggio: controllo della temperatura e dei tempi;
- Confezionamento. Rischio: moltiplicazione e contaminazione microbica. Azione preventiva: addestramento e rapidità del personale. Monitoraggio: controllo delle attrezzature e stato igienico dei materiali;
- Distribuzione. Rischio: moltiplicazione e contaminazione microbica. Azione preventiva: pulizia dei camion e delle celle. Monitoraggio: controllo della temperatura.

5. MALATTIE ALIMENTARI CAUSATE DAL CONSUMO DI ALIMENTI DI IV GAMMA

5.1 ASPETTI EPIDEMIOLOGICI DELLE MALATTIE ALIMENTARI

Le malattie alimentari possono essere provocate da batteri, parassiti e virus. Nonostante gli sforzi per isolare gli agenti responsabili, meno del 50% di tutte le cause degli episodi vengono identificate, a causa delle limitate capacità diagnostiche e della loro mancata denuncia (<http> 8).

I virus sono la causa più comune delle malattie alimentari, ma sono raramente ricercati e confermati per la breve durata e la natura autolimitante della malattia. Viceversa le malattie alimentari causate da batteri sono quelle più documentate.

Le malattie alimentari rappresentano un problema persistente causato dal consumo di cibi e bevande contaminati da agenti biologici e composti chimici. L'inizio di una malattia alimentare è di tipo acuto con una durata di circa 72 ore entro le quali si osserva risoluzione della stessa (Cantoni, 2011).

Esistono tre tipologie di malattia alimentare: l'infezione, la tossinfezione e l'intossicazione.

Le infezioni alimentari sono causate dall'ingestione di alimenti o bevande contaminate da batteri patogeni, i quali poi si moltiplicano e si propagano nel tratto intestinale. In alcuni casi l'infezione si trasmette direttamente dalle mani all'alimento e poi alla bocca, dopo aver toccato oggetti contaminati da materiale fecale. Il periodo di incubazione delle infezioni alimentari è in genere più lungo rispetto ai casi di intossicazione, come notevolmente più lunga è la durata dei sintomi. La principale via di trasmissione delle infezioni alimentari può essere diretta o indiretta per contaminazione fecale. (Perry *et al.* 2004).

L'intossicazione alimentare invece, è causata dall'ingestione di alimenti in cui sono proliferati batteri in grado di rilasciare tossine che provocano i sintomi della malattia; possono colpire una persona o possono provocare un'epidemia in un gruppo di persone che hanno mangiato lo stesso alimento contaminato.

Può essere provocata da una scorretta conservazione o da una cottura non completa.

Le tossinfezioni alimentari, infine, sono determinate dal consumo di alimenti contenenti sia tossine che microrganismi. In questo caso la tossicità è data sia dalle tossine preformate sia da quelle prodotte da cellule vive ingerite con l'alimento all'interno dell'ospite.

Gli incidenti più frequenti si sono osservati in case o ristoranti, e i principali fattori che contribuiscono alla comparsa di focolai sono la non conformità delle temperature di conservazione, la mancanza di una cottura completa e di una conservazione adeguata. Come emerge dal rapporto dell'EFSA Journal (2010), gli incidenti in un contesto casalingo si collocano al primo posto con il 38,7%, mentre quelli nei ristoranti si collocano al secondo posto con il 30,8%. Gli errori che possono portare ad un rischio alimentare sono:

- il non mantenimento della catena del freddo, dalla raccolta fino al consumo;
- l'utilizzo di coltelli, taglieri o mestoli e altri utensili non correttamente lavati dopo l'uso, sia in casa che nei ristoranti o nelle mense di ospedali, asili, scuole, ecc. Questo infatti può portare ad una *cross-contamination* (Verhoeff-Bokkenes 2011), cioè il trasferimento di microrganismi da un alimento nel quale, dal momento che va consumato previa cottura, non crea nessun danno, ad un alimento come l'insalata, nella quale dovendola consumare cruda, la stessa carica infettante rappresenta un rischio;
- la mancata o insufficiente conservazione a temperatura refrigerata, che favorisce lo sviluppo microbico.

Da un grafico dell'EFSA, emerge che nel 2010 i vegetali si collocano al quarto posto come veicolo di malattia alimentare, con una percentuale dell'8,7%, e che il maggior numero di focolai è stato causato da *Salmonella*, con 341 casi (48,9% del totale).

5.2 RISCHI IGIENICO SANITARI PER IL CONSUMO DI VEGETALI DI IV GAMMA

I rischi igienico-sanitari che derivano dal consumo dei prodotti di IV gamma, possono essere fisici, chimici, ma soprattutto microbiologici. Come detto precedentemente, l'incidenza di questi rischi dipende dalla modalità di coltivazione, produzione e conservazione di questi prodotti. Nel caso in cui si ingerisca un prodotto di IV gamma contaminato da microrganismi patogeni, probabilmente è possibile incorrere in una malattia alimentare.

Ecco alcune delle malattie più frequenti:

- Salmonellosi: sono presenti più di 2500 varianti ma le più diffuse sono *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. Per un adulto sano le possibilità di contrarre la malattia sono estremamente basse, sono invece maggiormente a rischio tutti i soggetti più recettivi, come neonati, anziani, immunodepressi e le donne in gravidanza. Ogni anno vengono segnalate epidemie di *salmonellosi* in tutto il mondo, e questa malattia è abbastanza diffusa anche in Italia.

Nell'uomo la salmonellosi ha un tempo di incubazione medio di 8-24 ore; la gravità dei sintomi è variabile. Si va da semplici disturbi intestinali (crampi, alcune scariche diarroiche) che si risolvono nell'arco di 24 ore, fino a forme gravi di diarrea con disidratazione, insufficienza renale, febbre elevata con brividi, nausea, cefalea e mialgie, in alcuni casi gravi l'esito è fatale.

La sintomatologia può regredire spontaneamente in circa 10 giorni ma in casi particolari può provocare disidratazione o dare localizzazioni extraintestinali (endocardio, sistema nervoso centrale, polmoni, ossa, articolazioni), specie in neonati, anziani o soggetti defedati. L'eliminazione dei germi con le feci può persistere per 1-6 settimane.

La cura si basa principalmente sulla reidratazione (bere molto o con flebo di soluzione fisiologica glucosata) e sulla correzione delle alterazioni elettrolitiche. L'uso degli antibiotici (chinoloni, cotrimoxazolo, amoxicillina), che possono prolungare lo stato di portatore, andrebbero

limitate a immunodepressi, o in caso di localizzazioni extraintestinali del batterio (E.Bruno, G.Cimurro, 2010).

- Campylobacteriosi: un'importante modalità di trasmissione di *Campylobacter* spp. è la contaminazione crociata tra alimenti crudi contaminati con il microrganismo, e alimenti pronti al consumo come i vegetali. *Campylobacter* spp. determinano la comparsa di sintomi dopo un periodo variabile da un giorno a una settimana dall'insorgere dell'infezione. Diarrea (frequentemente con tracce di sangue nelle feci), dolori addominali, febbre, mal di testa, nausea e/o vomito sono i principali sintomi di malattia e possono persistere per un periodo che varia da un giorno a una settimana, dopo cui, generalmente, la malattia si risolve spontaneamente. Molto raramente la campylobacteriosi provoca complicanze sia intestinali, quali pancreatite, colecistite, emorragie enteriche, sia extraintestinali, come artrite reattiva, infiammazione renale ed epatica. Raramente, l'infezione da *Campylobacter jejuni* può dare origine a una forma di neuropatia-immunomediata, conosciuta come Sindrome di Guillain Barrè (GBS), che si manifesta con improvvisa paralisi acuta (tetraplegia), accompagnata in alcuni casi anche da alterazione delle funzioni respiratorie. Nelle forme meno gravi e, se si interviene tempestivamente con cure mediche adeguate, si assiste a un lento recupero delle funzioni motorie e sensitive.

Le gastroenteriti da *Campylobacter* sono notevolmente aumentate in Europa nel corso di questi anni, tanto da superare i casi di *salmonellosi*, inoltre dal momento che spesso i casi di gastroenteriti non sono denunciate al medico si pensa che i dati riguardo la campylobacteriosi siano molto sottostimati.

Anche in questo caso nei soggetti con sintomatologia lieve la miglior cura è la reidratazione del soggetto, per sintomi più gravi, in persone immunodepresse è necessaria invece una cura antibiotica (Barco *et al.* 2010)

- Listeriosi: è considerata una malattia alimentare atipica, infatti causa danni estremamente gravi nei soggetti che colpisce. Le persone più a

rischio sono anziani, bambini, persone immunocompromesse e donne in gravidanza. Anche se le modalità di trasmissione da *Listeria* sono varie, la malattia nell'uomo è causata per lo più dell'ingestione di acqua e cibi contaminati. In natura il microrganismo si trova nelle acque, nel suolo, nei liquami e nel fango, ed è un organismo psicrotrofo che cresce tra gli 0 e i 45°C, questo permette la sua sopravvivenza nei cibi refrigerati e pronti al consumo, come gli ortaggi (Control of Communicable Disease in man, Chin, 2000) e, qualora l'alimento abbia una lunga *shelf life*, si può verificare anche la sua moltiplicazione.

I dati riguardanti l'incidenza delle infezioni causate da *Listeria* ci dimostrano che in Italia la malattia è piuttosto rara. Nell'uomo il batterio causa sintomi diversi, nelle donne in gravidanza può determinare dei sintomi simil-influenzali, con crampi intestinali, febbre, diarrea, seguiti da parto prematuro, morte in utero del feto o infezione del feto. Nei soggetti immunodepressi i sintomi sono per di più neurologici e l'infezione ha decorso iperacuto con probabile esito letale. Nei soggetti sani invece determina una sindrome gastroenterica febbrile ([http 9](#)) e iperplasia linfonodale.

- Yersiniosi: *Yersinia enterocolitica* è causa frequente di diarrea, è presente in tutti i continenti e la trasmissione dell'infezione si verifica attraverso l'ingestione di cibo e acqua contaminati, o meno frequentemente tramite il contatto con animali infetti. Si intende come cibo contaminato anche la carne di maiale poco cotta o refrigerata, in quanto è un dei principali serbatoi dell'infezione. O anche attraverso il consumo di germogli di fagioli. L'epidemia è più frequente nei mesi freddi. Dopo 4-7 giorni compaiono i sintomi della malattia rappresentati da febbre, crampi addominali, diarrea. La malattia può causare ulcerazioni della mucosa dell'ileo terminale. Possono manifestarsi anche fenomeni immunoreattivi che poliartrite, oppure eritemi nodosi. La terapia è antibiotica ([http 12](#)).

5.3 EPISODI DI MALATTIA ALIMENTARE CAUSATI DAL CONSUMO DI PRODOTTI DI IV GAMMA

Secondo un'indagine condotta dal Center for Science in Public Interest (CSPI) le verdure a foglia verde, risultano in cima ad un elenco di 10 prodotti, regolamentati dalla *Food and Drug Administration*, considerati più a rischio. Si stima, infatti, che questi insieme agli altri nove della lista siano causa di quasi il 40% di tutti i focolai di origine alimentare registrati dal 1990 al 2006 ([http 10](http://10)).

Trevisi (2011) riporta in un articolo apparso sul “Fatto alimentare” vari episodi di malattia alimentare derivanti da prodotti di IV gamma riscontrati negli USA.

Un focolaio di *E. coli* O157:H7 è stato identificato nella regione intorno a Saint Luis, Missouri. I casi segnalati comprendevano persone con un'età compresa tra gli 1 e i 94 anni. Molti avevano mangiato insalate fresche in un bar prima di ammalarsi. I funzionari del dipartimento di salute hanno dichiarato che le insalate erano sotto indagine, ma che altre fonti non erano da escludere. Analisi di rintracciabilità hanno determinato un'origine comune in una lattuga di un unico fornitore, arrivata in negozi di alimentari e campus universitari.

A fine Giugno i funzionari della sanità dell'Idaho hanno annunciato un'indagine su un focolaio di *Salmonella* Enteritidis, si sospettavano come causa dei germogli di erba medica contaminati. A partire dal 28 Giugno i casi sono stati resi noti in alcuni stati, e dal 1° Luglio sono stati ritirati dal mercato i germogli di erba medica distribuiti dal produttore identificato come responsabile.

In Maggio un'indagine su un focolaio di *Salmonella* Typhimurium in una catena di ristoranti dell'Illinois, ha individuato un ceppo raro di questo microrganismo: 36 contagiati, di cui 19 confermati in laboratorio. Gli investigatori hanno dichiarato che un'insalata fresca preparata in una sede comune era la causa dell'episodio. Non è però stato determinato come l'insalata è stata contaminata con salmonella.

Anche in Europa si sono verificati casi di intossicazioni e infezioni alimentari, uno dei più recenti in Germania il 22 Maggio 2011. Si è evidenziato un aumento di casi di sindrome emolitico-uremica e diarrea emorragica a partire dal 25 Aprile 2011. Sono stati colpiti adulti e giovani adulti tra i 20 e i 65 anni con una netta predominanza di donne. Il ceppo associato al focolaio è E. coli O:104 : H4, e il 10 Giugno 2011 le autorità tedesche hanno pubblicato una dichiarazione in cui raccomandavano di non mangiare nessun tipo di germoglio. Il 24 Giugno si è verificato un focolaio con 8 pazienti anche in Francia vicino Bordeaux e il 28 Giugno i casi erano raddoppiati a 16. Tutti i pazienti avevano dichiarato di aver mangiato germogli ([http 13](http://13)).

PARTE SPERIMENTALE

6. MATERIALI E METODI

Gli alimenti vegetali di IV gamma presi in considerazione in questa tesi, sono stati analizzati per la ricerca dei microrganismi patogeni, presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZS-Ve) sede di Legnaro dal mese di Ottobre 2011 al mese di Gennaio 2012.

Sui campioni è stata effettuata una ricerca con tecniche microbiologiche e una mediante PCR in modo tale da potere confrontare i risultati tra loro.

Sono stati analizzati 120 campioni di prodotti di IV gamma al termine della filiera, quindi già confezionati, prelevati direttamente da quattro delle principali aziende del Veneto, denominate con le lettere A, B, C, D.

I campioni venivano prelevati dall'azienda il Martedì mattina e già nel pomeriggio dello stesso giorno si eseguivano le analisi.

I microrganismi patogeni ricercati sono: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O:157, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter* spp.

I prodotti analizzati sono riportati in tabella 2.

Tabella 2. Prodotti della IV gamma analizzati nella ricerca.

| | | |
|-----------------|---------------------|-------------------|
| Rucola | Carote | Misticanza |
| Valerianella | Insalata Verde | Misticanza |
| Invidia Scarola | Insalata primavera | Prezzemolo |
| Radicchietto | Lattughino | Erbette |
| Cappuccio | Cuor di Lattuga | Spinaci |
| Radicchio rosso | Spinacio da cuocere | Bietina |
| Trittico | Insalata mista | Lattuga Iceberg |
| Pan di Zucchero | Radicchio Variegato | Lattughino Biondo |
| Insalata Briosa | Insalata Sfiziosa | |

Solo per alcuni è stata indicata l'origine della materia prima (tabella 3).

Tabella 3. Prodotti e origine della materia prima.

| PRODOTTO | ORIGINE MATERIA PRIMA |
|-------------------|------------------------------|
| mix di radicchi | Veneto |
| insalata sfiziosa | Veneto |
| Spinaci | Abruzzo |
| lattughino | Campania |
| Rucola | Campania |
| Valeriana | Lazio |
| insalata mista | Campania Lombardia Veneto |
| Altro | non registrato |

6.1 PROCEDURE ANALITICHE

Una procedura analitica approvata da normativa comunitarie precise, consente di determinare microrganismi seguendo schemi uguali in tutti i laboratori con l'opportuna certificazione.

Ad esempio la procedura di analisi ISO 6579:2002, stabilita nel Reg. CE n. 2073/2005, descrive i vari passaggi che consentono di determinare la presenza di *Salmonella* spp. in una matrice alimentare. I laboratori europei certificati ISO seguiranno la medesima metodica per la ricerca del microrganismo.

Durante lo svolgimento di una procedura di prova è obbligatorio creare e mantenere il più possibile la sterilità nel lavoro. Si utilizzano becchi *bunsen* che, con la loro fiamma libera creano un area sterile circoscritta, e si adoperano dispositivi di protezione individuale (DPI) per evitare la possibile contaminazione microbica dell'operatore.

Tutte le procedure ISO utilizzate e di seguito spiegate si accomunano per l'utilizzo di determinati strumenti.

Vengono usati: sacchetti sterili monouso, codificati, in cui pesare le unità campionarie con l'utilizzo di bilance di precisione. Pinze e forbici sterili per maneggiare e prelevare il campione. La quantità di campione prelevata dipende dalla procedura stessa, in genere per i microrganismi patogeni si pesano 25 g di campione. Si continua omogeneizzando in *stomacher* il prelevato a cui è stato aggiunto il terreno di prearricchimento.

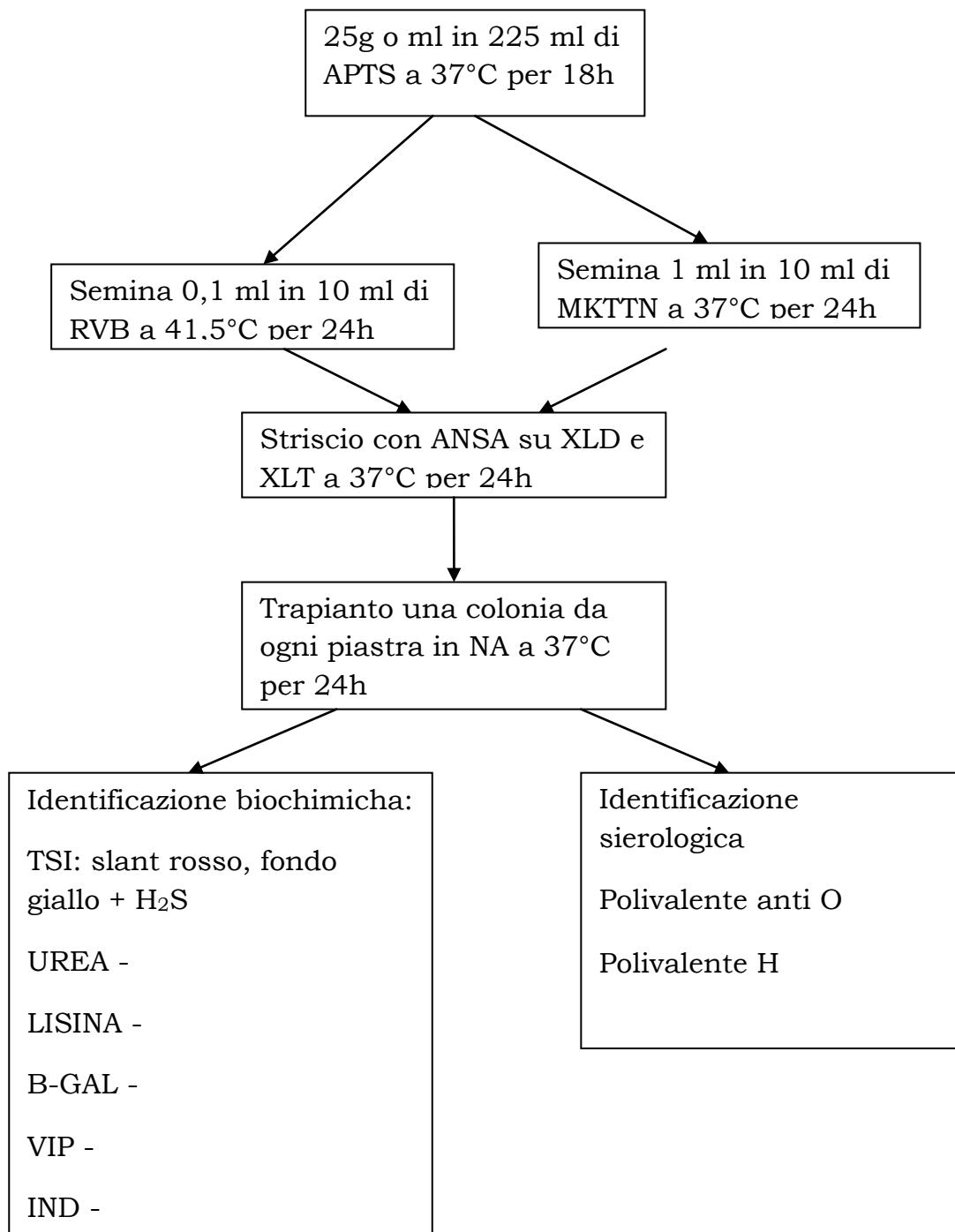
Altri strumenti usati sono: termostati, forno a microonde, bagnomaria, pipettatrice elettronica con le varie pipette sterili graduate a diversi volumi, da 1 a 25 ml, provettoni sterili per le varie diluizioni, piastre Petri sterili, anse di plastica, agitatore elettronico (vortex), terreni, soluzioni, reagenti e in alcuni casi, il conta colonie.

Infine per alcuni microrganismi si utilizza il microscopio ottico, e la ricerca del batterio richiede la colorazione di Gram.

6.1.1 Ricerca di *Salmonella* spp. a 37°C

La procedura di prova ISO 6579:2002 / Cor. 1:2004 descrive le modalità di ricerca di *Salmonella* spp. (figura 4).

Figura 4. Diagramma di flusso per la ricerca di *Salmonella* spp.



Esecuzione dell'analisi

Incubare l'omogenato in termostato a 37°C per 24h.

Traferire 0,1 ml di acqua peptonata tamponata (Buffer Peptone Water, BPW) in 10 ml di Rappaport Vassiliadis Broth (RVB) e 1 ml della stessa in 10 ml di Muller Kauffmann Tetrathionate Broth Base con aggiunta di Novobiocina MKTTN.

Strisciare un'ansata dell'arricchimento selettivo RVB su piastra Petri con Xylose Lisine Deoxycholate Agar (XLD) e una con Xylose Lysine Tergitol 4 Agar (XLT4) in modo da ottenere colonie ben separate. Incubare a 37°C per 24h.

Strisciare un'ansata dell'arricchimento selettivo MKTTN su piastra di XLD e XLT4 in modo da ottenere colonie ben separate. Incubare a 37°C per 24h.

Le colonie tipiche di *Salmonella* su XLD hanno la seguente morfologia: colonie con centro nero e una zona leggermente trasparente di colore rossastro dovuta al cambiamento dell'indicatore. Mentre su XLT4 si presentano rotonde, con diametro di 1-2-mm, traslucide con presenza di precipitato nero al centro e viraggio al rosa-rosso del terreno.

Per confermare la presenza di *Salmonella* si procede strisciando su Nutrient Agar (NA) almeno una colonia sospetta o tipica prelevata da ciascuna piastra di ciascun arricchimento selettivo. Si incubano a 37°C per 24h.

Conferma

Si effettuano le seguenti prove utilizzando colture pure:

- Triple Sugar Iron Agar (TSI): seminare con l'ago per infissione sul fondo e per strisciamento lungo lo *slant*. Le tipiche colture di *Salmonella* mostrano lo *slant* alcalino (rosso) e il fondo acido (giallo) con formazione di bolle di gas e H₂S.
- Urea Agar: si semina per strisciamento sullo *slant*. Il viraggio dal rosa al fuxia indica l'idrolisi dell'urea e, quindi, una reazione positiva. Se il colore rimane invariato la reazione è negativa, quindi è *Salmonella*.
- Lisina decarbossilasi: seminare con l'ansa subito al di sotto della superficie del terreno liquido. Se c'è l'enzima non si osserva nessun

viraggio del terreno (reazione è positiva), in assenza dell'enzima si nota un viraggio al giallo. *Salmonella* sp è positiva al test.

- β -galattosidasi: permette di differenziare i batteri lattosio-fermentanti, con l'azione di due successivi enzimi: β -galattosidasi e permeasi. Il metodo utilizza come substrato l'ortonitrofenil- β -D-galactopirannoside (ONPG) sostituendolo al glucosio del lattosio e rendendo la molecola più facilmente assimilabile da parte della cellula. La liberazione dell'ortonitrofenolo, quindi reazione positiva, è messa in evidenza con una colorazione gialla del substrato. *Salmonella* sp è negativa.
- Voges-Proskauer (VP): seminare con un'ansa una provetta di VP dopo la soluzione aggiungere due gocce di soluzione creatina, tre gocce di VP2. L'assunzione di una colorazione da rosa a rosso vivo entro 15 minuti indica una reazione positiva. *Salmonella* sp. è negativa al test.
- Indolo: seminare con un'ansa una provetta di Tryptone/Tryptophan medium (TTM). Dopo l'incubazione si aggiunge 1 ml di reattivo di Kovacs: se si forma un anello rosso violaceo la reazione è positiva, se invece è giallo allora è negativa. *Salmonella* sp. è negativa al test.

Tutte queste prove possono essere sostituite usando il kit commerciale per prove biochimiche API 20E (BioMerièux).

Salmonella è caratterizzata anche dalla presenza di antigeni: antigene somatico *O* e ciliare *H*, oltre all'antigene di virulenza *Vi*. La ricerca dell'antigene *H* e *O* viene fatta mediante agglutinazione su vetrino con i rispettivi sierotipi.

Espressione dei risultati

Nel Reg. CE n. 2073/2005 e nella normativa francese è stabilito che *Salmonella* spp. devono essere assenti in 25g di prodotto.

6.1.2 Ricerca di *Listeria monocytogenes* a 37°C

La procedura di analisi per la ricerca qualitativa di *Listeria monocytogenes* a 37°C fa riferimento alla ISO 11290-1:1996.

Esecuzione dell'analisi

Incubare in termostato a 30°C per 24h il campione prelevato e omogeneizzato con il brodo di prearricchimento (Half Fraser Broth, HFB).

Si pipettano 0,1 ml di HFB in 10 ml di brodo secondario di arricchimento selettivo, Fraser Broth (FB10); si incuba a 37°C per 48h.

Poi dallo stesso HFB si striscia un'ansata in Agar Listeria (ALOA) e in Listeria Selective Medium Oxford (OX). Successivamente dopo incubazione del FB10 (con o senza cambiamento di colore del brodo) si esegue analogo semina su terreni agarizzati. Si incuba a 37°C per 24h e se la crescita è scarsa e non si osservano colonie tipiche si reincuba per altre 24h.

Le colonie di *L. monocytogenes* in ALOA si presentano di colore verde-azzurro, circondate da un alone opaco, mentre le colonie sospette di *L. monocytogenes* in OXFORD si mostrano nero-verdastre, 2 mm di diametro, con centro nero infossato e un alone nero attorno.

Si procede poi con il test dell'emolisi, che consiste nel prelevare almeno 5 colonie sospette, da ciascuna piastra e dopo averle stemperate singolarmente in 1 ml di Soluzione Fisiologica (SF), si strisciano su Agar Sangue (AS) in modo da ottenere colonie ben isolate. Incubare a 37°C per 24h.

Verificata la presenza di colonie tipiche con emolisi, si procede strisciando la colonia emolitica in piastre di Tryptone Soy Agar + 0,6 % di estratto di lievito (TSA+YE). Incubare a 37°C per 18-24h fino a quando la crescita sia soddisfacente. Le colonie tipiche di *L. monocytogenes*, in TSA+YE si mostrano convesse, 2 mm di diametro, incolori, e opache con bordo intero.

Conferma biochimica

Si eseguono le seguenti prove dopo aver prelevato colonie da una coltura pura in YSA+YE:

- Tecnica di colorazione di Gram
- Catalasi: in una goccia di acqua ossigenata si stempera una colonia. La comparsa di bolle di gas indica la presenza dell'enzima *catalasi*.
- Zuccheri: l'utilizzo di *Xilosio* e *Ramnosio* si verifica mediante l'utilizzo dei pozzetti API *Listeria* (BioMerièux).
- API *Listeria*: è un sistema standardizzato per l'identificazione delle varie specie di *Listeria* che utilizza test miniaturizzati insieme a una base di dati specifica. Con l'ansa ad ago prelevare alcune colonie ben isolate e inserirle in una fiala di API *Suspension Medium* 2ml. Distribuire tale sospensione batterica nei pozzetti contenenti i terreni disidratati, richiudere la vaschetta di incubazione e incubare a 37°C per 18-24h. Dopo il tempo indicato aggiungere una goccia di reattivo *ZYM B* nella prima celletta e poi procedere alla lettura, utilizzando la tabella di lettura del test annotando +/- sulla griglia per la registrazione dei risultati. L'identificazione della specie *Listeria* è ottenuta attraverso un profilo numerico di 4 cifre, che per *L. monocytogenes* è 6150.
- CAMP test: strisciare i ceppi di *Staphylococcus aureus* e *Rodococcus equi* verticalmente in singola riga su una piastra di Agar Sangue così che le due colonne siano diametralmente opposte e parallele. L'inoculo deve essere sottile e solitamente viene fatto con l'ansa ad ago perpendicolare all'agar. Strisciare perpendicolarmente alle colture di *Staphylococcus aureus* e *Rodococcus equi* le colonie da testare, lasciando però da queste uno spazio di 1-2 mm. Contemporaneamente, strisciare le colture di controllo di *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. innocua*. Incubare a 37°C per 18-24 h. Un alone di β -emolisi più evidente all'intersezione del ceppo da testare con ciascuna delle colture di *S. aureus* e *R. equi* è considerato essere una reazione positiva. La reazione positiva con *R. equi* si evidenzia con un enorme alone (5-10 mm) di emolisi a "punta di freccia". La reazione positiva con *S. aureus* appare come un piccolo alone di

emolisi pronunciata che si estende per 2 mm circa dal ceppo da testare, all'interno dell'alone emolitico di *Staphylococcus aureus*.

Espressione dei risultati

I limiti fissati dalla legge riguardo questo patogeni sono molto restrittivi a causa della elevata pericolosità di questo patogeno nel causare malattia alimentare, in grado di portare anche alla morte del consumatore colpito. Se l'alimento non è considerato un terreno favorevole per la sua crescita, il limite fissato è di 100 UFC/g. Se invece si ritiene la matrice alimentare favorevole si procede con l'analisi qualitativa, che deve dimostrare l'assenza del patogeno in 25g di prodotto, e una quantitativa con limite di 100 UFC/g.

6.1.3 Ricerca di *Yersinia enterocolitica*

Essa fornisce le indicazioni sulla presenza di microrganismi responsabili di sindromi gastrointestinali su individui predisposti.

Questa ricerca fa riferimento alla norma ISO 10273:2003 e alla ISO 7218:2007. La ricerca di *Yersinia enterocolitica* può essere eseguita su campioni di alimenti destinati al consumo umano ed animale e campioni ambientali nelle aree di produzione e manipolazione di alimenti.

L'analisi è basata con l'utilizzo di 2 pre-arricchimenti e successivi isolamenti in terreni solidi e selettivi. Segue la conferma biochimica e di patogenicità.

Esecuzione dell'analisi

Omogeneizzare per 2 minuti 25 g di prodotto in 225 ml di Peptone Sorbitole Bile Salts Broth (PSB) e incubare a 25°C per 48-72 h in agitazione o per 5 giorni in assenza di agitazione. prima dell'incubazione però prelevare 1 ml di PSB appena seminato e addizionarlo a 10 ml di Irgasan Ticarcillina Potassium Chlorate Broth (ITC Broth). Incubare questo arricchimento a 25°C per 48 h.

Dopo l'incubazione, trasferire un'ansata di brodo cultura di PSB in una piastra di Yersinia Selective Medium (CIN) in modo da ottenere colonie ben isolate. Trasferire poi 0,5 ml di brodo cultura di PSB in 4,5 ml di S-KOH 0,5% e mescolare. Lasciare a contatto per 20 secondi (il KOH riduce notevolmente la flora contaminante), quindi trapiantare un'ansata in piastra CIN in modo da ottenere colonie ben isolate.

Dal brodo di coltura ITC trasferire un'ansata in piastra di *Salmonella/Shigella Agar with Sodium Desoxycholate and Calcium Chloride* (SSDC) in modo da ottenere colonie ben isolate. Incubare tutte le piastre capovolte a 30°C per 24 h. Esaminare le piastre così da individuare la presenza di colonie caratteristiche di *Yersinia enterocolitica*, che su CIN si mostrano piccole, lisce, con un centro rosso e un bordo traslucido con aspetto definito ad "occhio di bue", mentre in SSDC si mostrano piccole, circolari, grigie/incolore. Se non si presentano colonie, o non sono caratteristiche, continuare l'incubazione fino ad un massimo di 48 h.

Selezionare almeno 5 colonie caratteristiche/sospette, o tutte se presenti in numero inferiore, da ogni piastra di CIN e SSDC. Strisciare le colonie su piastre di Nutrient Agar (NA) in modo da ottenere colonie ben isolate. Incubare a 30°C per 24 h. Esaminare la purezza delle colonie in piastra di NA, se sono presenti colture miste procedere alla subcultura di ciascun tipo di colonia in ulteriori piastre di NA ed incubare come sopra.

Conferma biochimica

Dalle colture di NA eseguire la determinazione dell'ossidasi. Procedere, quindi, con l'identificazione presuntiva dalle colture pure in NA risultate negative all'ossidasi.

- Urea Indol Medium (UIM): seminare un'abbondante inoculo subito sotto la superficie del terreno UIM. Incubare a 30°C per 24 h. La reazione è positiva se la colorazione risulta rosso-rosa o rosso-viola. solitamente *Yersinia enterocolitica* mostra reazione positiva entro 1-5 minuti. La velocità di reazione può avere un valore diagnostico. Una colorazione

arancio-giallo indica reazione negativa. In questo caso si aggiunge alle provette 0,1-0,2 ml di reattivo di Kovac's per la determinazione dell'indolo.

- Kigler Iron Agar (KIA): seminare con l'ago per infissione sul fondo e per strisciamento lungo *slant*. Incubare a 30°C per 24-48 h. Se appare il fondo giallo la reazione è positiva, se appare rosso o non modificato, la reazione è negativa, se appare nero, significa che c'è stata la formazione di Idrogeno Solforato (H₂S), se ci sono bolle o rotture dell'Agar allora c'è stata formazione di gas da glucosio. Se invece lo *slant* è giallo allora è lattosio positivo, se appare rosso o non modificato allora è lattosio negativo.

Si continua poi con le colonie che hanno mostrato ossidasi negativa, urea positiva, indolo positivo o negativo, fermentazione del glucosio positiva, formazione di gas dal glucosio negativa, fermentazione del lattosio negative e formazione di H₂S negativa.

- API 20E: si utilizza il kit commerciale di identificazione biochimica API 20E (BioMérieux). Procedimento simile a *Listeria monocytogenes*.
- Eliminazione dei ceppi auto agglutinanti: porre una goccia di soluzione fisiologica su un vetrino pulito. Disperdere una parte di colonia da testare con l'ansa in modo da ottenere una sospensione torbida ed omogenea. Ruotare delicatamente il vetrino da 30 a 60 secondi. Osservare il risultato contro uno sfondo scuro. Se i batteri si associano in particelle più o meno distinte (frustoli), il ceppo è considerato auto agglutinante e non si potrà procedere alla sierotipizzazione.
- Conferma sierologica di presunta patogenicità: la ricerca di antigeni somatici O viene condotta mediante agglutinazione su vetrino con i rispettivi sieri, dopo aver eliminato i ceppi auto agglutinanti.
- Ricerca degli antigeni somatici O: usando una colonia non auto agglutinante, procedere come sopra utilizzando una goccia di siero anti-O al posto della soluzione salina. Se il ceppo agglutina la reazione è considerata positiva.

Espressione dei risultati

Indicare la presenza o assenza di *Y. enterocolitica* presunta patogena in 25 g o ml di prodotto.

6.1.4 Ricerca di *Escherichia coli* O:157

La ricerca di questo patogeno fa riferimento alla ISO 16654:2001.

Esecuzione dell'analisi

Incubare il campione con il brodo Triptone Soy Broth modificato (mTSB+N) con l'aggiunta di Novobiocina, preriscaldato a 41,5°C per 18-24h. Si procede con l'immunoseparazione magnetica (IMS). Questa tecnica consiste nella separazione e concentrazione dei microrganismi mediante particelle immunomagnetiche rivestite di anticorpi anti-*E.coli* O:157. L'IMS deve essere effettuata su aliquote della brodo cultura di arricchimento.

Per ciascun campione mescolare la brodo-cultura di arricchimento e lasciare sedimentare il materiale più grossolano. Dopo aver inizialmente agitato su vortex il contenitore del kit con le particelle immunomagnetiche, porne 20 µl in una provetta di tipo eppendorf e trasferirvi quindi 1 ml di brodo cultura del campione. Mescolare la sospensione ponendo la provetta in agitatore rotatorio per 10 minuti, porre la provetta in rack magnetico e agitare delicatamente in modo da far aggregare la particelle magnetiche. Aprire il tappo e utilizzando una pipetta diversa per ogni campione rimuovere il liquido sul fondo della provetta. Aggiungere 1 ml di tampone di lavaggio e richiudere. Dopo aver rimosso il magnete dal rack, mescolare invertendo delicatamente. Riposizionere il magnete. Le operazioni di lavaggio vanno ripetute di norma 3 volte evitando con cura le cross-contaminazioni. Alla fine a magnete rimosso risospendere le particelle magnetiche in 100 µl di tampone di lavaggio. Seminare 50 µl per piastra di Cefixime-Tellurite (CT-SMAC) e piastre di Mac Conkey Sorbitole Agar (SMAC) delle particelle sospese, ed incubare a 37 °C per 18-24 h.

Le colonie si presentano di 1 mm di diametro, trasparenti, incolore su SMAC e con sfumature giallo-brunastre al centro della colonia su CT-SMAC. Da ciascuna piastra si pescano cinque colonie tipiche e si seminano in Nutrient Agar (NA) le cui piastre vengono incubate a 37°C per 18-20 h.

Conferma biochimica

Le prove biochimiche vengono effettuate per mezzo dei kit commerciali per il test dell'agglutinazione e per API 20E (BioMerièux).

Espressione dei risultati

Il Reg. CE n.2073/2005 stabilisce come limite minimo (m) e massimo (M) rispettivamente 100 UFC/g e 1000 UFC/g di *E. coli*.

6.1.5 Ricerca di *Campylobacter* spp.

La metodica utilizzata per la ricerca di *Campylobacter* spp. fa riferimento alla ISO 10272-1:2006.

L'analisi è basata sull'isolamento e conferma di colonie caratteristiche in piastre di terreno selettivo dopo l'arricchimento il terreno liquido specifico.

Esecuzione dell'analisi

Incubare a 37°C per 4-6 h e successivamente a 41°C per 40-48 h in microaerofilia i 25 g di campione omogeneizzato in 225 ml di Bolton Broth. Si preleva un'ansa della brodo cultura e si effettua una semina per strisciamento su *Campylobacter* Charcoal Cefoperazone Desicholate Differential Broth (CCDA) e in una piastra di Skirrow. Si ripongono le piastre tenute in microaerofilia, in termostato a 41°C per 40-48 h.

Le colonie tipiche si presentano di colore bianco-grigio, con aspetto metallico, piatte e umide con tendenza a diffondere.

Conferma biochimica

Prendere da ogni piastra almeno una colonia considerata sospetta (operare in tempi stretti in quanto le colonie sono sensibili all'aria), strisciare la colonia selezionata in una piastra di Columbia Agar (CA) in modo da ottenere colonie ben isolate. incubare in microaerofilia a 41,5°C per 24 h.

Utilizzare le colonie pure per valutare morfologia, mobilità e crescita in microaerofilia a 25°C, crescita in anaerobiosi a 41,5°C e presenza dell'ossidasi:

- morfologia e mobilità: sospendere una colonia dalla piastra di CA in 1 ml di Brucella Broth ed esaminare la morfologia e la mobilità al microscopio.
- verifica della crescita a 25°C in microaerofilia: pescare una colonia isolata con l'aiuto di un'ansa e inoculare la superficie di una piastra di CA. Incubare la piastra a 25°C in microaerofilia per 40-48 h. esaminare la piastra per valutare la crescita di *Campylobacter* spp.
- verifica della crescita a 41,5°C in aerobiosi: pescare una colonia isolata con l'aiuto di un'ansa e inoculare la superficie di una piastra di CA. Incubare la piastra a 41,5°C in aerobiosi per 40-48 h. Esaminare la piastra per valutare l'assenza di crescita di *Campylobacter* spp.
- prova dell'ossidasi: utilizzo di un kit commerciale che contiene delle striscioline al cui apice è apposto un reattivo, la reazione è positiva quando stemperandoci sopra una colonia, il reattivo assume colore viola.

Le caratteristiche di *Campylobacter* spp. sono (tabella 4):

Tabella 4. Caratteristiche *Campylobacter* spp.

| | |
|---------------------------------|--------------------------|
| Morfologia | Piccoli bastoncini curvi |
| Mobilità | A spirale "a cavatappi) |
| Crescita in microaerofilia 25°C | Negativo |
| Crescita aerobia a 41,5°C | Negativo |
| Ossidasi | Positivo |

Espressione dei risultati

Il rispetto della normativa francese per i prodotti vegetali di IV gamma prevede l'assenza del microrganismo in 25 g.

6.2 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR-*Real Time*)

Come accennato precedentemente, 113 su 120 campioni dei prodotti di IV gamma analizzati microbiologicamente, sono stati analizzati anche tramite *Polymerase Chain Reaction (PCR) Real Time*.

La PCR è un procedimento inventato da Kary Mullis nel 1983, ed è efficace per produrre in vitro grandi quantità di una determinata sequenza di DNA (Miraglia *et al.*, 2004).

I requisiti essenziali della PCR sono:

1. due inneschi oligonucleotidici di sintesi (circa 20 nucleotidi ciascuno), chiamati *primers*, complementari a regioni dei filamenti opposti che fiancheggiano la sequenza di DNA bersaglio che servono da punto di attacco dell'enzima *Taq polimerasi*
2. una sequenza bersaglio del campione di DNA che si trovi tra i due *primer* e sia lunga da 100 a circa 35000 pb;
3. una DNA polimerasi termostabile capace di resistere a temperature superiori a 95°C.
4. i quattro deossiribonucleotidi.

Il tipico procedimento della PCR comprende numerosi cicli per amplificare una specifica sequenza di DNA e ogni ciclo di 3-5 minuti prevede tre fasi successive:

1. Denaturazione del DNA mediante riscaldamento in provetta a 95°C per circa 1 minuto. La provetta contiene il DNA di partenza, i due *primers* in eccesso, una DNA polimerasi termostabile, come la DNA polimerasi *Taq*, e i quattro deossiribonucleotidi.

2. *Annealing*: si abbassa lentamente la temperatura a 50-60°C in modo che i *primers* si appaino con le sequenze complementari del DNA di partenza.

3. Sintesi: la temperatura viene innalzata a circa 75°C per avere le condizioni ottimali per l'attività catalitica della *Taq* polimerasi che inizia la sua estensione dall'estremità ossidrilica 3' fino al termine dello stampo, utilizzando i dNTPs messi in eccesso e Mg²⁺ per stabilizzarla.

Nello specifico la PCR Real Time consente di conoscere la quantità di DNA target presente nella miscela di reazione in ogni momento grazie ad un sistema di monitoraggio del processo. Questo è possibile mediante l'impiego di marcatori fluorescenti il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione della PCR. Questi sono:

- coloranti intercalanti che si legano in maniera aspecifica a tutto il DNA a doppia elica
- sonde ad ibridazione, specifiche per il frammento di interesse, marcato con molecole fluorescenti, come le sonde FRET.

Le sonde FRET sono due sonde ognuna marcata con un solo fluorocromo (accettore e donatore). Quando non sono legate alle sequenze target il segnale fluorescente proviene dall'accettore non rilevato.

Durante lo step di *annealing*, entrambe le sonde FRET ibridizzano alle sequenze target: ciò avvicina il fluoroforo donatore all'accettore permettendo il trasferimento di energia tra i due fluorofori e la produzione di un segnale fluorescente da parte dell'accettore che viene rilevato.

Quindi gli apparecchi della Real Time PCR registrano ad ogni ciclo di PCR la fluorescenza associata all'amplificazione emessa dal campione.

Questo tipo di PCR non utilizza il gel di agarosio e l'analisi del prodotto di fluorescenza si attua tramite il computer.

7. RISULTATI

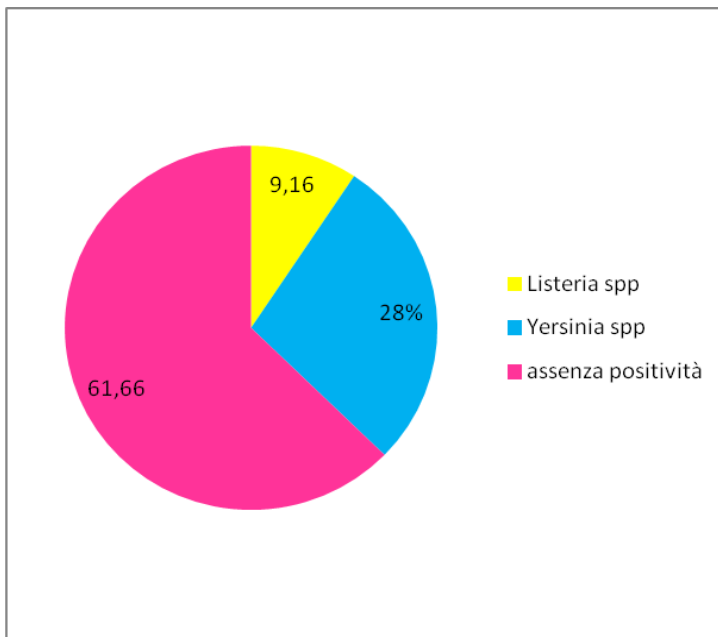
Dalla ricerca sostenuta su 120 campioni di prodotti di IV gamma (Grafico 1), è emerso che, 11 campioni sono risultati positivi alla ricerca di *Listeria* spp. (13,2% sul totale dei campioni), in particolare, 7 positivi a *L. monocytogenes*, 2 positivi a *L. innocua*, 1 a *L. ivanovi* e 1 a *L. seeligeri*. Rappresentano rispettivamente in percentuale l'8,40%, il 2,40% e l'1,20%.

La ricerca di *Salmonella* spp. invece non ha riscontrato la presenza del microrganismo in nessun campione.

Per quanto riguarda invece *Yersinia* spp. sono stati trovati 22 campioni positivi a *Y. enterocolitica*, 11 positivi a *Yersinia* O:8, e nessuno positivo a *Yersinia* O:9. In percentuale rappresentano il 39,6% sul totale dei campioni.

Infine, la ricerca di *Escherichia coli* e *Campylobacter* spp. non ha rivelato nessun campione positivo ai due microrganismi. Questi risultati riguardano solo la ricerca microbiologica nei prodotti di IV gamma analizzati.

Grafico 1. Rappresentazione della presenza/assenza dei patogeni ricercati nei campioni analizzati.



La metodica PCR invece ha fornito per alcuni microrganismi, uguali risultati, per altri, invece, sono stati identificati un numero minore oppure nessuno dei campioni rispetto alla ricerca con la metodica microbiologica classica. Risulta infatti che con PCR Real-Time sia stata evidenziata la presenza di *Listeria* spp. in 2 campioni, di *L. monocytogenes* in 1 campione, mentre per *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* e *Campylobacter* non è stata evidenziata la presenza in nessuno dei campioni analizzati; è da precisare però che in 1 campione per *Yersinia*, 3 per *E. coli* e 5 per *Campylobacter*, per un totale di 9 campioni, l'analisi è stata inibita, cioè la strumentazione non è stata in grado di verificare o meno la presenza del microrganismo. Le cause di questo possono essere la torbidità del liquido di arricchimento o la sua colorazione.

Tutti i campioni che sono risultati positivi non appartengono ad uno stesso tipo di prodotto, ma, al contrario presentano una grande varietà:

- carote, spinaci e lattuga per *Listeria* spp,
- due campioni di cuor di lattuga, quattro di radicchio rosso e uno di insalata mista per *L. monocytogenes*,
- spinaci, tritico, carote, insalata briosa, due campioni di cappuccio e quattro di radicchio rosso per *Yersinia* O:8, ed infine,
- cappuccio, cuor di lattuga, tritico, rucola, lattughino, lattughino biondo, insalata briosa, valeriana e insalata mista per *Yersinia* spp.

Questi campioni sono stati analizzati immediatamente dopo essere stati prelevati dall'azienda produttrice, già confezionati, pronti per essere consumati. Non è stata fatta, quindi, nessuna ricerca in merito alla *shelf-life* del prodotto o all'aumento della carica microbica nel tempo di conservazione.

Con i due grafici seguenti (Grafico 2, Grafico 3) voglio evidenziare la differenza di positività trovate con le tecniche microbiologiche e con la metodica PCR.

Grafico 2. Percentuale di campioni risultati positivi con la metodica microbiologica classica.

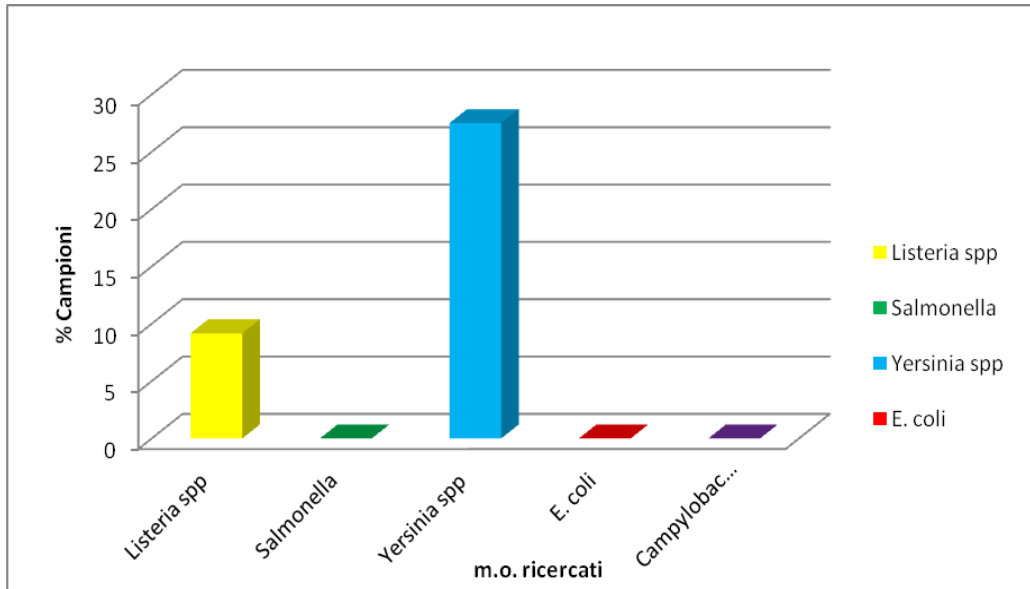
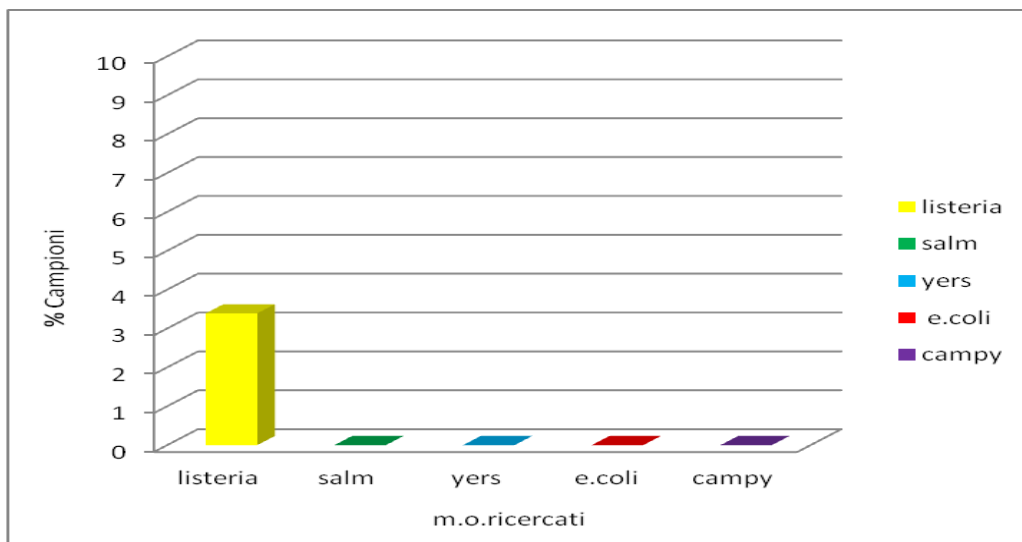


Grafico 3. Percentuale di campioni trovati positivi con la metodica PCR Real-Time.



Anche in questo caso, come in altri episodi, è doveroso mettere in evidenza il fatto che, essendo la metodica PCR molto più precisa rispetto alla metodica microbiologica classica, con la prima è stata evidenziata una positività minore rispetto alla positività riscontrata con la seconda metodica. Questa scarsa positività con PCR è dovuta, per *Listeria* spp., dal tipo di terreno di prearricchimento che presenta una sua intrinseca fluorescenza la quale influisce sull'emissione di fluorescenza del target di riferimento dando falsi positivi. Per quanto riguarda invece *Campylobacter* e *Yersinia enterocolitica* si sono verificati molti casi di inibizione del campione dovuti alla mancata amplificazione del Controllo Interno di Amplificazione (IAC) causata dalla presenza di elementi che interferiscono con essa. Questi elementi sono dei pigmenti presenti nel campione stesso, come ad esempio il colore rosso del radicchio rosso.

8. DISCUSSIONE

La fonte di interesse di questa tesi è la valutazione della qualità microbiologica dei prodotti di IV gamma.

Sono stati analizzati insalate semplici, misti di insalate, radicchio, spinaci, carote, ecc. per un totale di 120 campioni, dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Questa ricerca è stata fatta tra il mese di Ottobre 2011 e Gennaio 2012, prendendo in considerazione il campione prelevato direttamente dall'azienda e pronto al consumo.

Come si evidenzia dai risultati ottenuti, la qualità di questi prodotti è complessivamente accettabile. Infatti, i risultati dei campionamenti hanno mostrato che per *Salmonella* spp., *E. coli* e *Campylobacter* spp. sono rispettati i limiti imposti dal Reg. CE n. 2073/2005, in cui si prevede che *Salmonella* e *Campylobacter* spp. siano assenti in 25 g di prodotto; mentre per *E. coli*, le 5 aliquote analizzate rientrino o siano inferiori al limite minimo (m) 100 UFC/g ed al limite massimo (M) 1000 UFC/g. Invece, solo per *L. monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* sono stati trovati rispettivamente 7 e 22 campioni che non rispettano i limiti previsti, che, per *L. monocytogenes* obbligano ad una presenza massima di 100 UFC/g, e per quanto riguarda *Yersinia enterocolitica* prevedono l'assenza del microrganismo in 25 g di prodotto.

È interessante notare che il tipo di prodotto dove è stata evidenziata maggiore presenza di microrganismi è il radicchio rosso, con un totale di otto campioni, quattro per *Yersinia* O:8, e quattro per *Listeria monocytogenes*. . Si può pensare che il radicchio sia più soggetto a contaminazione microbiologica a causa della sua morfologia. Infatti, durante la coltivazione può essere contaminato o dal terreno oppure dell'acqua utilizzata per l'irrigazione, mentre, nelle fasi di lavaggio, mondatura e taglio, è possibile che le frequenti increspature delle sue foglie risultino un ottimo riparo per gli eventuali patogeni con cui può essere venuto a contatto nelle fasi di lavorazione. Delle quattro aziende da cui sono stati prelevati i campioni, che sopra sono state denominate A, B, C e D quella i

cui campioni hanno mostrato positività con maggiore frequenza è l'azienda B. Probabilmente questo risultato è legato sia alla carica microbica iniziale nella materia prima, sia alle modalità di lavorazione in azienda. È, infatti, il connubio tra una materia prima di qualità e il rispetto di buone tecniche di lavorazione ed igiene, che si basano su opportune GMP e possibile CCP individuati a determinare un prodotto pronto al consumo che deve essere anch'esso di qualità per garantire una sicurezza sanitaria al consumatore.

Confrontando i dati della ricerca dell'IZSVe con altri lavori quali:

- l' "indagine conoscitiva sui vegetali di IV gamma" sostenuta dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Umbria e Marche nel 2008. L'indagine è stata sostenuta nell'arco dell'anno, eseguendo 10 diversi campionamenti, di 10 campioni di insalate a foglia larga ciascuno, per un totale di 100 campioni durante le diverse fasi di produzione di una azienda marchigiana. Le analisi sono state effettuate lo stesso giorno del prelievo. La ricerca era qualitativa, per *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Y. enterocolitica* ed *E.coli* O:157.
- *Variation of microbial load and visual quality of Ready-to-eat salads by vegetable type, season, processor and retailer*, sostenuta dal Consiglio per la Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura, Centro per l'Orticoltura, Centro di Ricerca per l'Orticoltura, e dall'Università della Basilicata, Dipartimento di Biologia, Biotecnologie e Difesa Agro-forestali nel 2010. La ricerca è stata fatta su vari prodotti di IV gamma prelevati da punti di vendita al dettaglio, a Potenza e a Salerno. Sono stati analizzati 579 campioni provenienti da Salerno per 19 mesi, e per tutto l'anno 2007 i restanti campioni provenienti da Potenza, per un totale di 1000 campioni. Le analisi microbiologiche includevano la ricerca di *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e conta dei coliformi.
- Indagine sulle caratteristiche microbiologiche dei prodotti di IV gamma sostenuta dall'IZSVe di concerto con il Dipartimento SPPCIV di Padova e la collaborazione dell'IZSUeM e gli IZS del Nord Italia nel 2004. Sono

stati analizzati un totale di 285 campioni di insalate in foglia e insalate miste. I campioni sono stati prelevati direttamente dai punti vendita e sottoposti ad analisi a fine *shelf-life*. I microrganismi ricercati sono: *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *Campylobacter* spp., *E. coli* O:157, *Vibrio* spp., e gli alteranti come, carica microbica mesofila totale CMT e coliformi.

si può notare che hanno ottenuto risultati più o meno simili.

Dall'indagine del 2008, infatti, viene riportato che in nessun caso dei campioni analizzati, sono stati isolati i patogeni *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O:157, *L. monocytogenes* e, alla fine della *shelf-life*, *E. coli* addirittura diminuisce fino a sparire.

Nella ricerca del 2010 è risultato che né *Salmonella* né *Listeria* sono state trovate, mentre *E. coli*, invece, è stata ritrovata in tutti i mesi eccetto Aprile.

Infine, nella ricerca fatta nel 2004 emerge che l'indice di inquinamento fecale valutato con la presenza di *E. coli* risulta relativamente basso, che il 13,7% di campioni ha riscontrato positività per *Y. enterocolitica* e solo l'1,4% è risultato positivo a *Salmonella*.

Risulta, quindi, evidente che anche la ricerca effettuata dall'IZSve di Legnaro nell'autunno/inverno 2012 riporta risultati conformi a queste tre indagini effettuate alcuni anni fa, l'unica differenza che si nota ampiamente è la presenza di *E. coli* seppur in minima misura, nelle indagini del 2004 e del 2010. È stato evidenziato però che a fine *shelf-life* questo microrganismo addirittura diminuisce drasticamente, in quanto ha grosse difficoltà di moltiplicazione a temperatura di refrigerazione. È probabile quindi, che nella ricerca effettuata dall'IZSve, non sia stato ritrovato *E. coli* perché tutte e quattro le aziende da cui provengono i campioni abbiano rispettato meticolosamente la catena del freddo. Al contrario invece è stata ampiamente ritrovata *Yersinia enterocolitica* sia dall'IZSUeM nel 2004 che dall'IZSve nel 2011-2012 probabilmente proprio perché questo microrganismo ha una grande capacità di sopravvivere ed eventualmente moltiplicare a T di refrigerazione.

Ecco le due positività messe a confronto.

Grafico 4. Patogeni ritrovati nel 2004

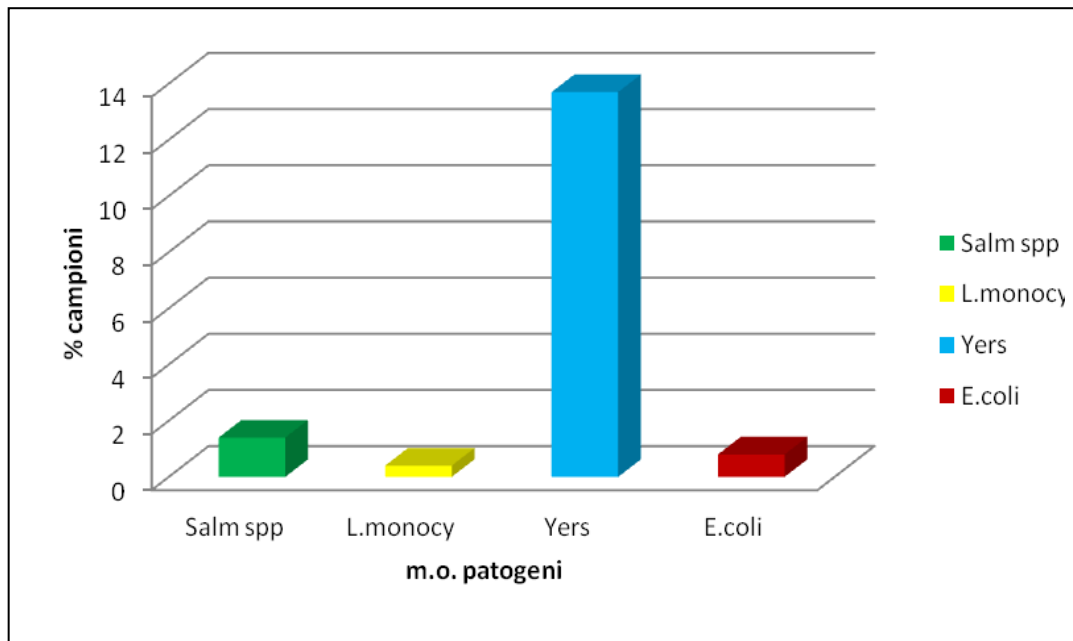
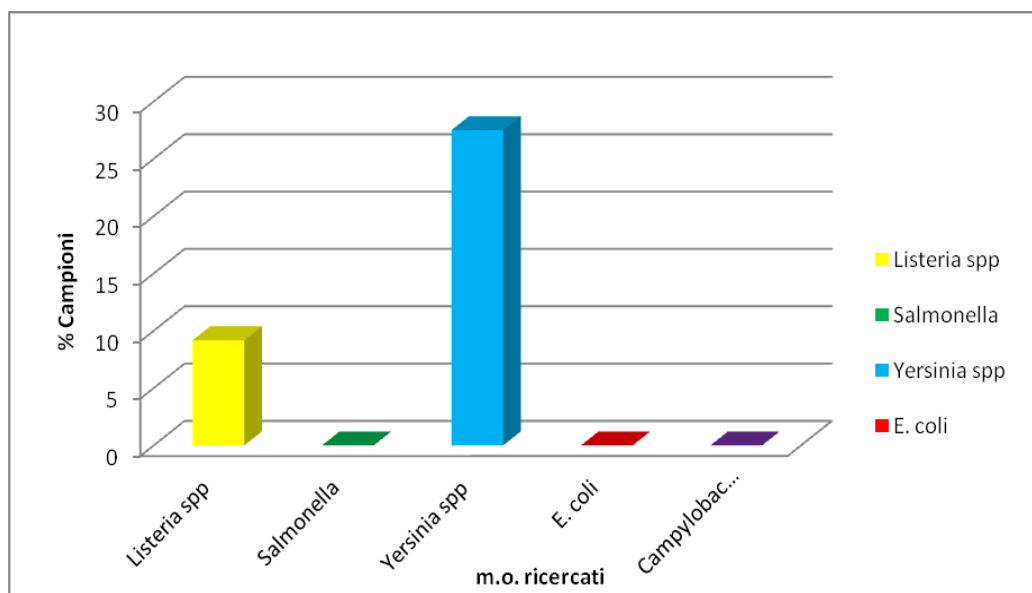


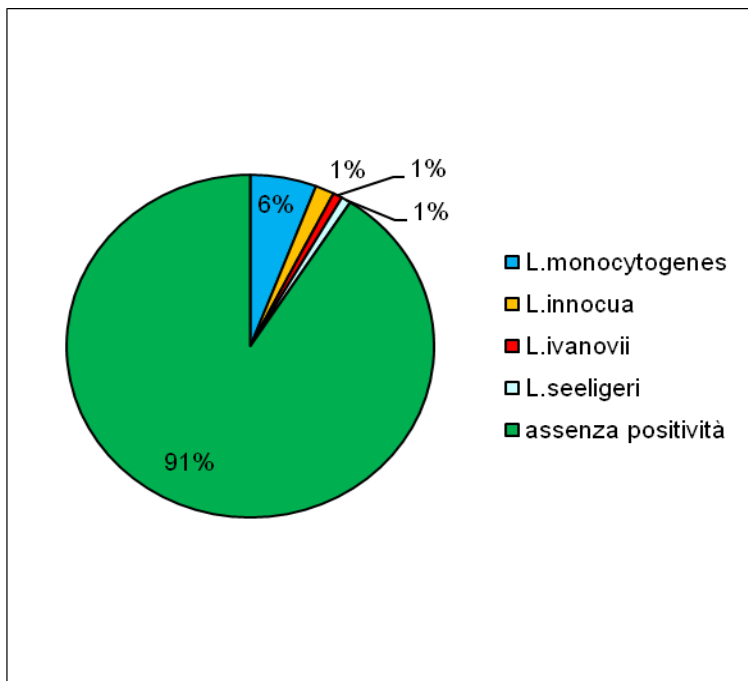
Grafico 2. Patogeni ritrovati nel 2011-2012



Infine nella ricerca del 2011/2012 sono state ritrovate positività per *Listeria* spp. (Grafico 5), anche questo microrganismo è psicrotrofo e crescendo a

temperatura tra gli 0 e i 45 °C si moltiplica molto facilmente a temperatura di refrigerazione se il prodotto, come potrebbe essere nel nostro caso venisse contaminato con acqua di lavaggio a sua volta contaminata, o utilizzando macchinari come la centrifuga per l'asciugatura, non perfettamente igienizzati e sanificati, o altri utensili contaminati in altre fasi di produzione.

Grafico 5. Prevalenza di *Listeria* spp. nel 2011/2012



È importante, quindi, svolgere continui controlli per garantire la sicurezza di questi prodotti che non sono soggetti a trattamenti di calore e a tenere sotto controllo la pericolosità di questi stessi patogeni che potrebbero divenire causa di epidemie alimentari. Infine, è evidente che una materia prima di qualità, il rispetto della catena del freddo, le buone norme igieniche, lo svolgimento in modo appropriato del lavaggio e dell'asciugatura e delle GMP, unite ai risultati soddisfacenti delle analisi microbiologiche, sono i fattori che permettono di ottenere un prodotto di IV gamma di qualità garantita.

9. CONCLUSIONI

I vegetali di IV gamma, negli ultimi anni hanno sostenuto un *boom* economico grazie alla loro praticità. Sono prodotti già mondati, tagliati, lavati e confezionati che se per un aspetto, permettono di risparmiare tempo, dall'altro spingono il consumatore verso prezzi di acquisto 5 volte più elevati rispetto all'insalata di I gamma. Per questo tipo di prodotti che non sono sottoposti ad alcun trattamento termico, è di notevole importanza garantire la qualità dal punto di vista microbiologico dalla materia prima, durante tutto il processo produttivo, fino al consumatore finale. Anche in Italia, negli ultimi anni sono stati fissati dei limiti di legge riguardo alla presenza dei microrganismi alteranti e patogeni che ritroviamo nel Reg. CE n.2073/2005 insieme alle metodiche di analisi (EN ISO).

Nel processo produttivo dei *Ready-To-Eat* diverse sono le possibilità di contaminazione: dalla materia prima, al personale e perfino l'acqua di lavaggio. Infatti, quest'ultimo se non viene svolto correttamente può essere fonte di ulteriori contaminazioni.

Questa indagine è svolta tenendo sotto osservazione, con periodiche analisi eseguite nell'arco di tre mesi, da Ottobre 2011 a Gennaio 2012, la presenza o assenza di microrganismi e la loro proliferazione nelle varie fasi di produzione.

Nella ricerca sostenuta dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, si sono considerati i seguenti patogeni: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter spp.* Sono state prese in esame buste di insalate e prodotti di IV gamma confezionate in atmosfera modificata MAP, prelevate direttamente dalle quattro più grandi aziende produttrici del Veneto da noi denominate A, B, C e D. Sono state controllate varietà diverse di insalate semplici (radicchio, valeriana, lattughino, rucola ecc), mix di insalate, spinaci, carote ecc.

È stata ottenuta una valutazione soddisfacente dei prodotti campionati: con metodica microbiologica classica si sono ottenute percentuali diverse da zero, solo per *Yersinia enterocolitica* e *Listeria spp.*, mentre per il resto di patogeni non è stata evidenziata alcuna positività, con metodica PCR Real-Time invece è stata trovata una bassa percentuale di positività solo per *Listeria spp.*

La qualità dei prodotti di IV gamma deriva quindi, dall'uso di materie prime di qualità, dal rispetto della catena del freddo e dalle buone prassi igieniche, dall'applicazione di tutte le possibili GMP (come igiene ed istruzione del personale), dall'individuazione degli appropriati CCP e da un attento monitoraggio delle flore contaminanti nelle varie fasi di produzione, da parte dell' Operatore del Settore Alimentare (OSA) stesso, in rispetto del Reg. CE n. 2073/2005.

10. BIBLIOGRAFIA

Barco L., Cibin V., Mioni R., Tiozzo B., (2010), “Campylobatteriosi, un rischio alimentare emergente?”. *Appunti di scienza* 6. IZSVe

Bruno E., Cimurro G. (2010), “Salmonella e salmonellosi: sintomi, terapia e gravidanza”. *Farmaco e Cura*.

(<http://www.farmacocura.it/malattie/salmonellosi-sintomi-terapia-gravidanza/>)

Caponigro V., Piro F.(2010), “Variation of microbial load and visual quality of ready-to-eat salads by vegetable tipe, season, processors and retailer”. *Food Microbiology* 27 (2010) 1071-1077

Caponigro V., Piro F (1998). “Requisiti della materia prima per la quarta gamma”. *L'informatore agrario* 19, 39-42

Cantoni (2011). “Malattie provocate dagli alimenti”.

(<http://www.usl3.toscana.it/allegati/Dati%20CERTA/articolinuovi/22-%20Cantoni.pdf>)

Casati D., Baldi L. (2010), “Il trend è positivo. Ora va consolidato”. *Terra e Vita* 27, 32-36

Chin (2000), “Control of communicable disease in man”, Manuale per il controllo delle malattie trasmissibili. DEA

EFSA *Journal* “EU Summary report on zoonoses zoonotic agent and food-borne outbreaks 2010”

Kramer, Cantoni (2011). “Alimenti, microbiologie e igiene”. Tecniche Nuove

Miraglia M., Berdol KG., Brere C., Corbisier P., Holst-Jensen A., Kok EJ., Marvin HJ., Schimmel H., Rentsch J., Van Rie JP., Zagon J. (2004), *Detection*

and traceability of genetically modified organism in the food production chain.
Food Chem Toxicol.

Perry JJ., Staley JT., Lory S., 2004. "Microbiologia". Ed. Zanichelli, Bologna.

Trevisi A. (2011), "Stati Uniti: le contaminazioni alimentari più gravi del 2011. Molti cibi "insospettabili" possono essere coinvolti". Il Fatto Alimentare.

Verhoeff-Bokkenes L. *et al.* (2011). "Consumption of raw vegetables and fruit: A risk factor for *Campylobacter* infections". International Journal of Microbiology 144 406-412.

NORMATIVE CONSULTATE

Regolamento CE n.2073/2005 della commissione, del 15 Novembre 2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. Gazzetta Ufficiale n.L338 del 22/12/2005 pag 001-0026

Regolamento CE n.852/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 Aprile 2004, sull'igiene dei prodotti alimentari. Gazzetta Ufficiale L139 30/04/2004 pag 1

Legge del 13 Maggio 2011, n.177. Disposizioni concernenti la preparazione, il confezionamento e la distribuzione dei prodotti ortofrutticoli di quarta gamma. Gazzetta Ufficiale L118

SITOGRAFIA:

http 1: www.quartagamma.info

http 2: www.cavallarozucche.altervista.org/pdf/02_pp_1_24.pdf

http 3: www.fosvi.it

http 4: www.freshplaza.it

http 5: www.mapadipa.org

http 6: www.orsacampania.it

http 7: www.venetoagricoltura.regeione.veneto.it

http 8: www.epicentro.iss.it

http 9: www.izsvenezie.it

http 10: www.ceirsa.org

http 11: www.silsismi.unimi.it

http 12: www.antropozoonosi.it

http 13: www.prevenzione.ulss20.verona.it

Ringraziamenti

Voglio ringraziare il Professor Paolo Catellani per la disponibilità, la pazienza e la chiarezza. Il Dott. Renzo Mioni e tutti i tecnici del laboratorio di microbiologia dell'Istituto Sperimentale Zooprofilattico delle Venezie per avermi insegnato con pazienza e chiarezza il lavoro di laboratorio durante il tirocinio, e per i consigli e gli aiuti durante il periodo di stesura della tesi, ma anche per avermi accolta con disponibilità e per aver reso piacevoli e talvolta addirittura divertenti i miei giorni insieme a loro! Ringrazio poi la mia famiglia, perché nei momenti di panico, o mi ha calmata, o mi ha fatta totalmente impazzire! E infine la mia super compagna di sventure Marina perché “mal comune mezzo gaudio!”.