



Università degli Studi di Cagliari  
**DOTTORATO DI RICERCA  
IN TOSSICOLOGIA**

CICLO XXVII

**Sicurezza alimentare di prodotti ortofrutticoli di IV gamma**

**Food Safety of ready to eat vegetables**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

MED/42 IGIENE GENERALE E APPLICATA

*Presentata da:*

Dott.ssa Clara Sanna

*Coordinatore Dottorato:*

Prof. Gaetano Di Chiara

*Relatore:*

Dott.ssa Valentina Coroneo

Esame finale anno accademico 2013 - 2014

## **RINGRAZIAMENTI**

*Desidero esprimere la mia sincera gratitudine alla Dott.ssa Valentina Coroneo, per il suo ruolo fondamentale nello svolgimento del mio lavoro di dottorato: con la sua supervisione e i preziosi insegnamenti ha contribuito alla mia maturazione scientifica e mi ha dimostrato come dietro ad ogni difficoltà si nasconda l'opportunità di superare i propri limiti.*

*La mia gratitudine va a tutto il gruppo di lavoro del Laboratorio di Igiene degli Alimenti. La Dott.ssa Antonella Pinna, il Sig. Gerolamo Carrucciu, il Sig. Antonio Manca, la Dott.ssa Adriana Sanna, la Dott.ssa Valentina Carraro, la Dott.ssa Alessandra Ruggeri, la Dott.ssa Barbara Meloni, la Dott.ssa Sara Succa e la Dott.ssa Valeria Brandas, perché non c'è niente di più bello che svolgere il lavoro che si ama insieme ai propri amici.*

*Un grazie colmo di sincero affetto va alla Prof.ssa Orietta Massidda per i suoi impagabili consigli.*

*Infine, ringrazio con tutto il cuore Simone e mia madre per avermi incoraggiata, sostenuta e supportata durante questi tre anni e per avermi "sopportata" in questi ultimi mesi.*

# Abstract

## Introduction

Vegetables are major components of healthy and balanced diet. However, 25% of foodborne diseases are linked to the consumption of vegetables, especially the minimally processed ready to eat (RTE) vegetables. The main foodborne pathogens associated at RTE vegetables are *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Salmonella* spp. and *Yersinia* spp.) and psychrophilic microorganisms like *Listeria monocytogenes*.

## Aim of study

The aim of this work was to assess the microbiological risks associated with consumption of RTE salads, through the quantification of microbiological contamination. In addition we carried out the rapid detection of foodborne pathogens by real time PCR, and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* strain isolated in this study. Microbiological and bio molecular challenge tests was carried out for assess potential growth of *Listeria monocytogenes* in vegetables stored at different temperatures. Besides, the work was focused on the evaluation of washing process in association to the shelf life of these products.

## Materials and methods

A total of 300 pre-packaged mixed raw vegetable salads collected from retail premises (68%) and production plants (32%) were examined. Microbiological eligibility for human consumption (Reg CE 1441/2007) is based on three bacteriological parameters (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *L. monocytogenes*). In order to assess the safety of RTE vegetables, all parameters required by law have been investigated. The contamination of vegetables from *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp was also investigated by real time PCR. Furthermore, the pathogenic properties of *L. monocytogenes* have been evaluated by PCR assay (*prfA*, *rrn*, *hlyA*, *actA*, *inlA*, *inlB*, *iap*, *plcA* e *plcB*). The purpose of Challenge test was to provide information especially on the behavior of *L. monocytogenes*.

## Results and conclusion

Parsley and mixed salads showed the most contaminated panel, however we found high levels of contamination by *Enterobacteriaceae* in every kind of RTE salads. *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7 have never been isolated, while only a sample of rocket was contaminated by one strain of *L. monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. The PCR assay showed the virulence genes of *L. monocytogenes* strain (*prfA*, *rrn*, *actA*, *inlA*, *inlB*, *plcA*, *plcB*). Washing temperature, microbiological quality of water and raw material are basic requirements to achieve high

microbiological standards for RTE salads. *Listeria monocytogenes* shows a growth potential variable in consideration of the different types of products and storage temperatures. Bio molecular challenge tests appear a useful tool for the evaluation of the survival of *L. monocytogenes* when cultural results seem uncertain (eg. high or low bacterial growth and difficulty in estimating the growth plate).

## **CAPITOLO 1**

### **1.1 Sicurezza alimentare e qualità dei prodotti alimentari**

La qualità di un alimento è fortemente influenzata dal processo produttivo lungo l'intera filiera. La produzione di "alimenti di qualità", dove alla base del concetto di qualità sussiste sempre il requisito della sicurezza igienico sanitaria, oltre a rappresentare un obiettivo di Sanità Pubblica, risulta essere un importante traguardo per tutte le realtà produttive.

Il concetto di sicurezza dei prodotti alimentari, seppur incentrato sulle ripercussioni per la salute del consumatore, rappresenta anche un aspetto fondamentale per il corretto funzionamento del mercato: le emergenze sanitarie associate al consumo alimenti portano inevitabilmente a una perdita di fiducia da parte dei consumatori nei confronti dell'intero sistema produttivo. Di conseguenza, gli operatori delle imprese alimentari sono maggiormente responsabilizzati e inseriti in un contesto di collaborazioni attive volte al miglioramento qualitativo dei propri prodotti.

I prodotti alimentari di origine vegetale sono fondamentali per una dieta sana ed equilibrata e la loro assunzione è raccomandata senza limitazioni quantitative (OMS). Un adeguato consumo di vegetali svolge un ruolo importante nelle fasi dello sviluppo, della crescita e nella prevenzione di patologie croniche quali malattie cardiovascolari, tumori, diabete e morbo di Alzheimer (1, 2, 3, 4).

Le esigenze della vita moderna spesso inducono i consumatori a ritmi frenetici che rendono difficoltose le preparazioni alimentari a volte anche semplici da servire in tavola; da qui scaturisce l'esigenza di un prodotto pratico, che permetta di risparmiare tempo e che sia facilmente fruibile in differenti situazioni. Per soddisfare tali esigenze il mercato propone svariate tipologie di prodotti alimentari pronti per essere consumati senza venire sottoposti a preparazioni eccessivamente prolungate.

### **1.2 I prodotti vegetali di IV gamma**

I prodotti di IV gamma (o *minimally processed, ready to eat, o fresh cut*) sono rappresentati da preparazioni alimentari a base di vegetali (orticoli o frutticoli) che dopo la raccolta sono sottoposti a processi produttivi di minima entità prima di essere immessi sul mercato, confezionati in vaschette o buste termo sigillate, pronti per il consumo.

Risultano particolarmente apprezzati dai consumatori per via della loro praticità e freschezza. Le verdure, confezionate subito dopo essere state raccolte, mantengono il gusto, le caratteristiche nutrizionali e sensoriali che le contraddistinguono.

I vegetali di IV gamma sono rappresentati da gruppi molto eterogenei contraddistinti da caratteristiche igienico-sanitarie differenti.

### 1.3 Caratteristiche nutrizionali dei prodotti vegetali di IV gamma

I prodotti vegetali di IV gamma sono generalmente caratterizzati da un buon contenuto in vitamine e sali minerali. Il modesto potere calorico (15-30 Kcal/100g) è determinato dal ridotto contenuto in proteine, glucidico e grassi (Tab1).

Tab.1 Valori nutrizionali dei prodotti vegetali di IV gamma (fonte dati INRAN)

Componenti	Lattuga	Rucola	Valerianella	Cicorie	Carote	Prezzemolo	Spinacio	
Acqua (g)	95.60	91.00	90.00	95.00	91.60	87.20	90.00	
Proteine (g)	1.10	2.60	2.00	1.20	1.10	3.70	2.00	
Glucidi (g)	2.20	3.90	2.00	0.10	7.6	-	2.00	
Lipidi (g)	0.10	0.30	0.40	0.10	0.20	0.60	0.40	
Fibra alimentare (g)	1.50	0.90	1.70	1.50	3.10	500	1.70	
Valore energetico (Kcal)	14.00	28.00	19.00	12.00	35	20.00	19.00	
Sali minerali (mg)	Sodio	-	-	4.00	7.00	95.00	20.00	4.00
	Potassio	-	468.00	370.00	180.00	220.00	670.00	370.00
	Ferro	0.90	5.20	-	1.50	0.70	4.20	-
	Calcio	46.00	309.00	93.00	150.00	44.00	220.00	-
Vitamine (mg)	Fosforo	22.00	41.00	-	26.00	37.00	75.00	-
	Tiamina	0.04	-	-	0.03	0.04	0.10	-
	Riboflavina	0.09	-	-	0.08	0.04	0.21	-
	Niacina	0.40	742.00	-	0.30	0.70	0.60	-
	A	194.00	110.00	425.00	267.00	1148.00	943.00	425.00
C	59.00	-	38.00	8.00	4.00	162.00	38.00	

### 1.4 Diffusione del prodotto nel Mondo e Italia

I prodotti di IV gamma fecero la loro prima comparsa nel mercato americano intorno agli anni '60 e da allora la loro presenza nei mercati d'oltreoceano è diventata sempre più consistente. Solo nei primi anni '80 iniziò la commercializzazione nei mercati europei (dapprima in Francia, poi Regno Unito, Germania, Svizzera e Italia)(5).

La richiesta da parte dei consumatori tende a prediligere prodotti caratterizzati da un'elevata praticità di utilizzo. In particolare, nel settore dei prodotti di IV gamma si è assistito all'aumento dell'offerta da parte delle aziende produttrici: le classiche insalate in busta sono state affiancate da spinaci lavati, snack di carote, cubetti di cipolla, prezzemolo tritato, sacchetti e vassoi di verdure preparati con salse fresche per il condimento e vaschette di frutta (mango, ananas, pesche, melone, arance, mele) già provviste di cucchiaino per la degustazione. Ciò nonostante, da una recente indagine condotta da Coldiretti (6) sui cambiamenti delle abitudini alimentari degli italiani, sulla base dei dati Ismea (7) relativi ai primi nove mesi del 2014, si evidenzia come la spesa dei consumatori per le verdure di IV gamma nel 2014 sia diminuita del 13% rispetto allo stesso periodo del 2013. Negli ultimi annigli acquisti familiari di frutta e verdura sono diminuiti di oltre il 20%. I consumi medi di ortofrutta degli italiani nel

2014 si sono stabilizzati intorno a 130.6 chili a persona, equivalenti a non più di 360 grammi al giorno, ben al di sotto del limite di 400 grammi consigliato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). Inoltre solo il 18.4 per cento della popolazione (8) ha consumato quotidianamente almeno quattro porzioni tra frutta, verdura e legumi freschi. Questa diminuzione dei consumi dei vegetali di IV gamma, determinata forse dalle esigenze di risparmio degli italiani, rappresenta una netta inversione di tendenza in un settore che negli ultimi dieci anni è cresciuto in maniera costante ed ha portato l'Italia, nel 2013, a occupare il primo posto in Europa per la vendita dei prodotti di IV gamma, seguita da Gran Bretagna, Francia e Germania (9).

Per quanto concerne i gusti degli acquirenti italiani, tra le verdure di IV gamma si registra un andamento nelle vendite completamente differente tra le insalate monovarietalì, i cui acquisti sono aumentati del 3.2% e le insalate miste che hanno visto un calo dell'8% circa del volume di acquisti.

### **1.5 La produzione di ortaggi in Italia.**

Secondo i dati del CSO (Centro Servizi Ortofrutticoli) relativi al periodo 2007-2009, l'Italia e la Spagna sono i maggiori produttori di ortaggi in Europa rispettivamente con il 21 e il 20% della produzione totale. Circa il 75% della produzione Italiana è consumata allo stato fresco, mentre il restante 25% è destinato all'industria conserviera (5, 10).

Il mercato ortofrutticolo è suddiviso in differenti comparti sulla base delle caratteristiche merceologiche principali con particolare attenzione all'utilizzo delle diverse tecnologie conservative (11):

**Prodotti di I gamma:** ortaggi e verdure fresche non lavorate, sono introdotti nel mercato immediatamente dopo la raccolta o dopo un breve periodo di conservazione. Questi prodotti mantengono inalterate le caratteristiche qualitative iniziali ma sono soggetti a una forte deperibilità.

**Prodotti di II gamma:** verdure stabilizzate (conservate sotto olio o sotto aceto), indicati commercialmente come "prodotti in scatola", sono soggetti a tecnologie di conservazione che prevedono trattamenti termici quali la sterilizzazione e la pastorizzazione. Il notevole incremento del periodo di conservazione è ottenuto a discapito delle caratteristiche intrinseche del prodotto che perde gran parte delle proprietà nutritive, compreso il tenore vitaminico.

**Prodotti di III gamma:** verdure surgelate, la lavorazione a freddo permette di ottenere un periodo di conservazione mediamente lungo associato ad una ridotta alterazione delle caratteristiche organolettiche e nutrizionali iniziali.

**Prodotti di IV gamma:** verdure e ortaggi freschi puliti, tagliati, confezionati in vaschette e pronte per il consumo. Il tempo di conservazione è di circa 7 giorni purché il prodotto sia mantenuto ad una temperatura di refrigerazione.

**Prodotti di V gamma:** sono compresi i semilavorati già cotti (precotti, grigliati, scottati al vapore) non surgelati e conservati sottovuoto. Il periodo di conservazione medio è di circa 10-16 giorni, purché il prodotto sia conservato a temperature di refrigerazione.

Le verdure utilizzate per la produzione delle insalate di IV gamma sono rappresentate da insalate adulte (I gamma) e “ortaggi da foglia da taglio” (“*Baby leaf*”), raccolti in uno stadio di sviluppo variabile da 20 a 40 giorni, quando le piante si trovano ancora nella fase di crescita attiva.

Nel caso degli ortaggi “*Baby leaf*”, l’unico indice di maturazione è definito dalla loro altezza che, può variare in base alle specie e alle esigenze commerciali dai 50-70 mm fino agli 80-120 mm. Non esistono delle sementi selezionate per la coltivazione di ortaggi di quarta gamma da taglio, attualmente molto del germoplasma disponibile è quello delle insalate adulte adattato per la produzione di ortaggi “*Baby leaf*”.

Le varietà comunemente utilizzate nella preparazione di prodotti di IV gamma sono rappresentate da lattughe da taglio (*Lactuca sativa* L.), rucola (*Diplotaxis tenuifolia*), spinacio (*Spinacia oleracea*), valerianella (*Valerianella olitoria*), cicorie (gen.*Cichorium*), carote (*Dracus carota*) e prezzemolo (*Petroselinum crispum*)(12).

### 1.5.1 Lattughe da taglio

Le lattughe (*Lactuca sativa* L.) sono rappresentate da varietà botaniche molto diverse tra loro: il colore della foglia è variabile e si evidenzia con diversificazioni consistenti dell’intensità di verde, a tonalità di rosa e rosso più o meno accentuate, fino al violetto molto scuro. Sulla base delle indicazioni della Comunità Europea (13), la classificazione sistematica prevede le varietà botaniche di seguito riportate:

- *Lactuca sativa* var. *capitata* (L.) Janchen, comprendente la lattuga a cappuccio sia a foglia liscia sia a foglia riccia (iceberg).
- *Lactuca sativa* var. *crispa* L., comprendente la lattuga da taglio, la lattuga foglia di quercia e la lollo.
- *Lactuca sativa* var. *longifolia* (Lam.) Janchen, comprendente la lattuga romana e romanella.
- *Lactuca sativa* var. *angustana* Irish x Bremen, comprendente la lattuga da stelo.



### 1.5.2 Rucola

Con il termine rucola s'intendono in realtà le foglie, di numerose specie appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae* caratterizzate da un caratteristico sapore forte e piccante. Tali foglie sono generalmente impiegate crude o più raramente cotte. Le specie maggiormente conosciute e coltivate sono rappresentate da:

- *Eruca vesicaria* (L.) Cav., comunemente detta rucola coltivata, è una pianta erbacea annuale, con una rosetta di foglie a livello del terreno, lunghe fino a 200 mm e larghe fino a 60 mm, piuttosto spesse e con nervatura centrale ben evidente, lobi poco profondi, dentati o incisi con picciolo corto.
- *Diplotaxis tenuifolia* DC., comunemente detta rucola selvatica o ruchetta, è una pianta erbacea perenne con foglie morfologicamente simili ma notevolmente più strette (lunghe 100-200 mm, larghe 15-25 mm) rispetto alle foglie di *E. vesicaria*.

### 1.5.3 Spinacio

Lo spinacio (*Spinacia oleracea* L.) è una pianta erbacea annuale, con radice fittonante, le cui foglie presentano un picciolo più o meno lungo (40-60 mm). Le caratteristiche foglie bollose sono generalmente di forma triangolare, mentre il colore è variabile dal verde chiaro al verde intenso.

### 1.5.4 Valerianella

La valerianella (*Valerianella locusta* L. Laterr.), è una specie erbacea spontanea in tutto il bacino del Mediterraneo, presenta foglie intere, uninervie, spatolate oppure oblungo-lanceolate sessili, lunghe 50-100 mm, di colore verde lucente.

### 1.5.5 Cicorie

Al genere *Cichorium* afferiscono 7-8 specie di piante annuali o perenni, tra cui *Cichorium endivia* L. e *Cichorium intybus* L. rivestono la maggior importanza da un punto di vista orticolo. Il sapore delle cicorie varia dal dolce all'amaro con differenti gradi di intensità in relazione alla varietà e all'epoca di conservazione (il sapore amaro diminuisce di intensità alle basse temperature).

- *Cichorium endivia* L. comprende due varietà botaniche, conosciute rispettivamente con il nome di scarola (*Cichorium endivia latifolium* Lam.) e indivia (*Cichorium endivia crispum* Lam.).

- *Cichorium inthybus* L. offre una grande variabilità di piante con foglie estremamente diverse per forme, colori e dimensioni; tra queste, le varietà botaniche interessanti per la produzione dei vegetali di IV gamma sono la cicoria “Pan di zucchero”, il radicchio “Treviso” (Trevigiano) e “Chioggia”.

### **1.5.6 Carota**

La carota (*Dracus carota*), è una pianta erbacea dal fusto di colore verde, biennale, coltivata per il fittone radicale: è ricca di vitamina, sali minerali e zuccheri semplici come il glucosio.

### **1.5.7 Prezzemolo**

Il prezzemolo (*Petroselinum crispum*) è una pianta biennale le cui foglie, completamente glabre, presentano un contorno triangolare frastagliato; rappresenta una tra le erbe aromatiche maggiormente utilizzate in cucina e viene aggiunto alle pietanze al termine della cottura in modo da preservare le proprietà organolettiche delle sue foglie.

## **1.6 Ambiente e tecniche di coltivazione**

La superficie e le quantità da produrre per ciascuna specie sono generalmente definite in base alle esigenze dell'industria di trasformazione, anche se la costante attività produttiva durante tutto il corso dell'anno risente della mancanza di alcune cultivar adattate per le stagioni estreme (inverno/estate) come lo spinacio e la rucola.

La coltivazione delle materie prime utilizzate avviene principalmente in campo (Fig. 1, 2, 3), nel caso delle insalate adulte e in serra-tunnel con copertura di plastica per gli ortaggi da foglia da taglio.

La coltivazione in serra permette di avere una produzione che copre l'intero arco dell'anno, con accelerazione dei cicli colturali, maggiori garanzie di sanità, pulizia e controllo delle fitopatie e prevenzione di danni provocati da eventi meteorici avversi come pioggia battente e/o grandine: in un anno, nello stesso tunnel, possono essere eseguiti 6-7 cicli colturali, con raccolte variabili in numero da 9 a 13 in relazione alla specie e al numero dei ritagli.

Il risultato della coltura è strettamente legato a un'attenta gestione dei parametri climatici (temperatura, grado di umidità e illuminazione) che si osservano all'interno di serre e tunnel. Tali parametri possono essere in parte limitati attraverso il controllo delle aperture o l'utilizzo di impianti di riscaldamento canalizzati, in grado di garantire un dislivello termico tra l'interno e l'esterno di 15-20°C. Tale intervento, sempre necessario quando si vogliono velocizzare i cicli produttivi durante i periodi più freddi, permette di tenere sotto controllo il

grado di umidità relativa delle colture prevenendo l'insorgenza di danni alle colture come, attacchi di peronospora (*Peronospora*), moria delle piante (*Pythium*), gamba nera (*Phoma*), fusariosi (*Fusarium*), marciume del colletto (*Sclerotinia*) e altre.

In condizioni climatiche favorevoli, le specie considerate possono essere coltivate in qualsiasi tipo di terreno: la semina diretta e in alcuni casi il trapianto, rappresentano le tecniche con cui ha inizio la coltura. Un corretto piano di concimazione deve essere ponderato sulla base dello stato chimico-fisico del terreno e delle esigenze nutrizionali di macro e micronutrienti in relazione al programma annuale di successione colturale. Nonostante gli ortaggi da taglio si adattino bene a essere coltivati in terreni asciutti, una buona irrigazione è essenziale per migliorare la produzione e ottenere foglie croccanti e poco fibrose. Il sistema d'irrigazione utilizzato deve essere caratterizzato da portate medio-basse ( $70-120\text{L h}^{-1}$ ) e gittate modeste (3-5m) in modo da garantire una distribuzione uniforme dell'acqua e non provocare l'insorgenza di danni alle foglie (calpestamento e imbrattamento). I sistemi largamente più diffusi, sono i microirrigui a copertura integrale per aspersione con spruzzatori statici (*sprayer*) o dinamici (*sprinkler*), solitamente montati su barre irroratrici mobili e dotati di dispositivi antinebbia e anti goccia al fine di migliorarne le prestazioni in termini di uniformità del getto.

La coltivazione fuori dal suolo rappresenta, per le verdure da foglia da taglio, un'alternativa al metodo di coltura classico: queste tecniche permettono da un lato il controllo della flora spontanea infestante e dall'altro un buon aumento delle rese dovuto all'intensificazione dei cicli produttivi grazie anche ad un maggior controllo dell'apporto di nutrienti fornito alle piante. Le piante, fissate su un supporto di varia natura (polistirolo, PE, tappeto di lana di roccia) sono disposte in maniera da evitare il contatto tra l'apparato radicale e il terreno. L'apporto dei nutrienti avviene tramite l'utilizzo di una soluzione nutritiva che in base alla tecnica utilizzata può essere spruzzata direttamente sulle radici (Coltivazione aeroponica), sul supporto (*Plant plane hydroponics* o Flusso e riflusso su tappeto) o contenuta all'interno di vasche in cui galleggiano i supporti (*Floating system*) (12).

Fig.1, 2, 3 coltivazione in campo



### 1.6.1 La raccolta

La raccolta rappresenta la fase finale del periodo di coltivazione: eseguita in corrispondenza della maturazione commerciale ottimale e non della reale maturazione della pianta, prevede l'utilizzo di particolari accorgimenti al fine di provocare il minor danno possibile al prodotto raccolto.

Il processo di raccolta può essere effettuato sia manualmente che meccanicamente: generalmente le insalate adulte vengono raccolte manualmente, ciò permette all'operatore di attuare una più attenta selezione del prodotto in base al grado di maturazione (specialmente nel caso di colture con maturazione scalare) e la riduzione dei danni meccanici con conseguente aumento della *shelf life*. La raccolta meccanica invece è utilizzata principalmente per gli ortaggi da foglia da taglio (rucola, lattughino, valerianella) in quanto consente di

ridurre in modo considerevole tempi e costi dell'operazione (risparmio della manodopera sino al 50%).

La raccolta delle verdure destinate all'industria di IV gamma rappresenta dunque un punto fondamentale per la qualità del prodotto finale e per la sua conservabilità: ritardi o anticipi del periodo di raccolta possono influenzare notevolmente la produzione. L'elevata diversità morfologica, fisiologica e di composizione chimica dei prodotti orticoli richiede nella fase di post-raccolta una specifica gestione dei trattamenti e delle condizioni di stoccaggio per massimizzarne l'efficacia e limitare la perdita di qualità.

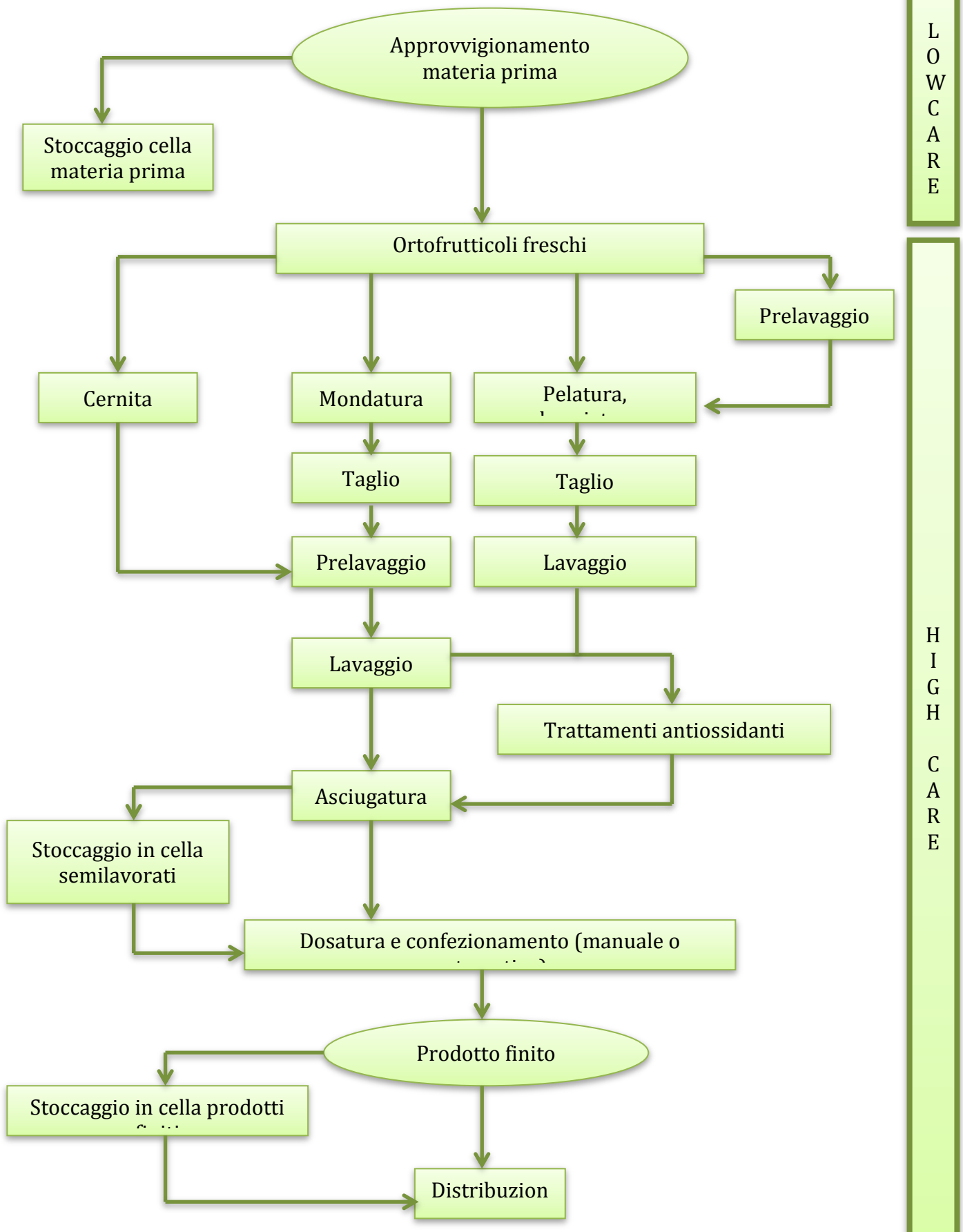
### **1.6.2 Processo produttivo dei vegetali di IV gamma**

I prodotti vegetali di IV gamma, prima di essere commercializzati, sono sottoposti a processi tecnologici che seppur di minima entità determinano l'insorgenza di elevati livelli di stress a carico dei tessuti vegetali: allo scopo di mantenere inalterata la freschezza del prodotto e di incrementarne il valore commerciale e la sicurezza d'uso, è fondamentale tenere sotto controllo la temperatura, sia negli ambienti di lavorazione che durante la commercializzazione (14).

Il processo produttivo dei vegetali di IV gamma è disciplinato dalla Legge n.77/2011: "Disposizioni concernenti la preparazione, il confezionamento e la distribuzione dei prodotti ortofruttili di IV gamma" e dal relativo regolamento (15). Inoltre, il produttore, a titolo volontario può riferirsi alle indicazioni contenute nella norma UNI 11350:2010 "Prodotti ortofruttili freschi pronti per il consumo (IV gamma), definizione, requisiti e principi generali"(16).

Gli stabilimenti di produzione, in ottemperanza a quanto indicato nel Reg CE 852/2004 (17), devono possedere requisiti strutturali tali da garantire la qualità igienica del prodotto, permettendo un'esecuzione lineare delle procedure produttive in modo da contenere il rischio di contaminazioni: per soddisfare tale esigenza è necessario suddividere gli ambienti di lavorazione in aree a "bassa attenzione" (*low care*) dove, in genere, avviene la cernita e selezione e aree ad "alta attenzione" (*high care*) dove viene praticato il lavaggio, l'asciugatura e il confezionamento (Fig. 4).

Fig. 4 Diagramma di flusso del ciclo di produzione di Prodotti di IV gamma.



### **1.6.3 Approvvigionamento e stoccaggio della materia prima**

I prodotti orticoli sono e rimangono anche nel post-raccolta dei tessuti vivi: soggetti a continui mutamenti che per la maggior parte portano a un irreversibile decadimento qualitativo, devono essere tempestivamente trasferiti al magazzino di conservazione e lavorazione e mantenuti a temperature controllate. Il trasporto dal campo al magazzino andrebbe eseguito preferibilmente nelle ore più fresche della giornata e in caso di tempi di percorrenza superiori alle 2-3 ore con l'ausilio di mezzi di trasporto refrigerati. Le materie prime, immagazzinate immediatamente dopo il ricevimento, devono essere mantenute a temperatura di refrigerazione in locali separati da quelli destinati allo stoccaggio di semilavorati e prodotti finiti, mentre gli ambienti di lavorazione devono essere mantenuti a una temperatura che garantisca il mantenimento del prodotto ortofrutticolo a meno di +8°C.

### **1.6.4 Cernita e mondatura**

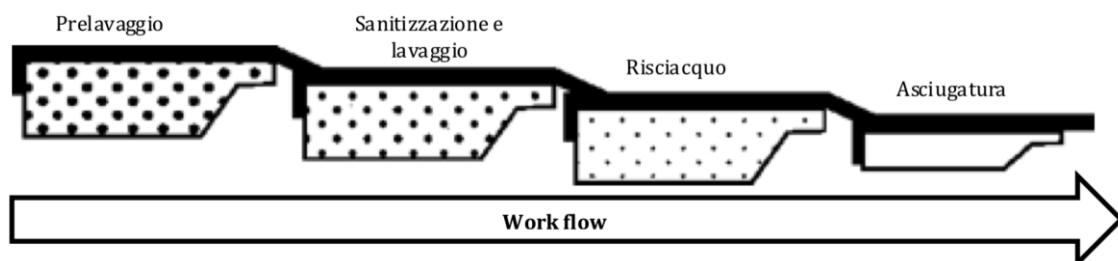
Sebbene gran parte delle fasi del processo di lavorazione siano meccanizzate, per alcune di esse è ancora fondamentale la presenza di mano d'opera specializzata: gli ortaggi, selezionati manualmente, dopo una prima cernita, pulitura e mondatura sono indirizzati alla produzione. Con l'ausilio di un nastro trasportatore, le verdure giungono alla macchina taglierina, dove le foglie sono tagliate in maniera uniforme prima di essere introdotte nelle vasche di lavaggio. Il trauma fisico subito dal tessuto vegetale durante il taglio, porta a ripercussioni sulla qualità del prodotto: la rottura delle cellule vegetali e il conseguente aumento della superficie interessata da fenomeni di ossidazione e attività enzimatiche portano a un acceleramento dei fenomeni che provocano il deperimento del prodotto. È perciò fondamentale, al fine di contenere gli effetti dello stress da taglio, l'utilizzo di lame rotanti lisce sempre ben affilate in modo da ridurre al minimo eventuali lacerazioni e slabbrature (18).

### **1.6.5 Lavaggio**

Il processo di lavaggio rappresenta una fase importante nella produzione dei prodotti ortofrutticoli di IV gamma: eseguito con acqua di qualità potabile, oltre a favorire la cicatrizzazione delle ferite da taglio e rallentare i processi fisiologici dei vegetali, porta all'eliminazione di corpi estranei, impurità e all'abbattimento della carica microbica, ma non mostra particolare attività nei confronti di biofilm batterici e microrganismi internalizzati attraverso stomi e ferite (19).

Il lavaggio, ponderato sulla base della materia prima trattata, è effettuato all'interno di vasche disposte in linea (Fig. 6).

Fig. 6 Vasche di lavaggio in serie.



Le vasche di lavaggio sono caratterizzate da peculiarità differenti in relazione al tipo di prodotto da trattare: il sistema maggiormente utilizzato, detto “a borbottaggio” è caratterizzato dall'immissione di aria nell'acqua che ne determina il gorgogliamento. Ciò permette di eliminare più agevolmente tracce di terra o corpi estranei di altro genere (Fig.7, Fig. 8, Fig. 9, Fig.10). Talvolta, le vasche di lavaggio sono dotate di scambiatori di calore al fine di mantenere sotto controllo il livello termico della soluzione di lavaggio (temperature uguali o inferiori a 8°C). Il prodotto è sottoposto dapprima a una fase di prelavaggio (5-10l di acqua per 1 kg di prodotto) mirata all'eliminazione di corpi estranei grossolani e residui di terra e solo successivamente passa alla vasca di lavaggio e sanitizzazione (3-5l di acqua per 1 kg di prodotto) dove, oltre all'acqua possono essere utilizzati additivi ad azione antibatterica generalmente a base di ipoclorito di sodio ( $\text{NaOCl}$ ) o di calcio ( $\text{CaCl}_2\text{O}_2$ ), biossido di cloro ( $\text{ClO}_2$ ), cloro gassoso ( $\text{Cl}_2$ ).

Le verdure sanitizzate sono convogliate poi alla vasca di risciacquo: in questa fase è utilizzata esclusivamente acqua potabile, che a discrezione del produttore può essere addizionata da sostanze anti-imbrunimento (acido ascorbico, acido citrico e loro sali). L'acqua utilizzata durante il processo di lavorazione viene reimessa all'interno delle vasche di risciacquo e di disinfezione, dove in automatico è controllato e aggiustato il livello del cloro prima che ricominci un nuovo ciclo di lavaggio.

### 1.6.6 Lavaggio: alternative all'utilizzo del cloro

La limitata azione del cloro nei confronti dei microrganismi internalizzati, i problemi ambientali per la salute dei lavoratori, la presenza di residui come i triometani associati al suo utilizzo, evidenziano la necessità di trovare metodi di lavaggio alternativi (20, 21, 22) da utilizzare nella produzione di prodotti vegetali di IV gamma.



### **Ozono (O<sub>3</sub>)**

Approvato nel 2001 dalla FDA (23) come agente antimicrobico per il trattamento, lo stoccaggio e la trasformazione di prodotti alimentari (24, 25), l'ozono è un composto gassoso, instabile che si decompone rapidamente in acqua, di conseguenza per essere introdotto nel normale processo di lavorazione dei prodotti vegetali di IV gamma, deve essere prodotto in loco in grandi quantità. L'attività antimicrobica dell'ozono nel processo di lavaggio dei vegetali è paragonabile a quella del cloro con una riduzione della contaminazione pari a 1.8 Log contro i 2.0 Log del cloro (26, 27, 28). L'ozono, caratterizzato da un forte potere ossidante, può corrodere le superfici metalliche delle apparecchiature comunemente utilizzate nei processi industriali: la vita delle apparecchiature, mostra un impatto negativo sulla sua praticità d'uso in un ambiente industriale.

### **Irradiazione**

L'uso di raggi gamma è stato (29) approvato dalla FDA, fino a 4 Gy, per controllare i patogeni di origine alimentare e prolungare la *shelf life* della lattuga, iceberg e spinaci (30, 31). L'adozione su larga scala nel settore ortofrutticolo non è ancora stata presa in considerazione: è necessaria un'attenta valutazione della tolleranza di frutta e verdura alle differenti dosi di radiazioni necessarie per il controllo dei patogeni. Inoltre anche la percezione negativa che il consumatore ha degli alimenti irradiati potrebbe rappresentare un fattore limitante all'adozione di questa tecnologia (32).

### **Nitrato d'argento e perossido di idrogeno**

Il nitrato d'argento a basse concentrazioni è stato utilizzato come disinfettante in piscine e per l'acqua potabile (33); la sua combinazione con il perossido di idrogeno è stata inoltre valutata come possibile alternativa alla clorazione. L'argento ha mostrato una maggiore efficacia nell'abbattimento delle cariche microbiche rispetto al cloro (34), ma non sono noti i livelli di eventuali residui nel tessuto vegetale e di conseguenza non si conosce il potenziale effetto tossicologico dei residui del trattamento (35).

### **Acqua elettrolizzata acidificata**

Il lavaggio dei prodotti vegetali di IV gamma con acqua elettrolizzata permette di ottenere un abbattimento della contaminazione batterica simile al trattamento col cloro, tale risultato però

è ottenuto dall'aumento del tempo di permanenza delle verdure in acqua che dovrebbe essere ridotto per evitare l'insorgenza di danni ai tessuti vegetali.

Nonostante la costante ricerca di nuove soluzioni per il processo di lavaggio, il cloro rappresenta ancora il metodo di disinfezione più utilizzato nella produzione dei vegetali freschi (36, 37), a causa della facilità di utilizzo in ambiente industriale, della buona efficacia a basse temperature e del basso costo.

### **1.6.7 Asciugatura**

Al termine del lavaggio i vegetali sono destinati all'asciugatura: l'allontanamento dell'acqua in eccesso ha lo scopo di evitare che sul prodotto, una volta confezionato, si abbia un'accelerazione dei processi deteriorativi per opera della flora batterica residua. Il processo di asciugatura può essere compiuto con l'utilizzo di centrifughe (Fig. 11) e tunnel ad aria: nel caso di centrifugazione, è necessario tener presente che, se troppo drastica può provocare danni ai tessuti e influenzare negativamente la durata conservativa del prodotto (*shelf life*). I tunnel ad aria sottopongono i vegetali a una successione di flussi di aria secca con temperature di circa 40°C per poi terminare con un flusso di aria fredda (4-6°C). Il prodotto asciutto presenta delle caratteristiche qualitative migliori in confronto a quanto si ottiene con la centrifuga.

### **1.6.8 Confezionamento**

Il prodotto asciutto è pronto per il confezionamento e in relazione alla tipologia di prodotto e confezione può essere manuale o automatizzato (Fig.12). Nel caso di confezionamento automatizzato, il prodotto asciutto passa sui nastri trasportatori verso la pesatrice, costituita da una serie di scomparti che ricevono il materiale da pesare: una volta raggiunto il peso prefissato, il prodotto è lasciato cadere attraverso un convogliatore che lo indirizza al confezionamento.

Il confezionamento dei vegetali di IV gamma deve garantire il mantenimento della freschezza del prodotto per tutta la durata della *shelf life*, preservando i vegetali da eventi meccanici, valorizzandone la qualità e invogliando il consumatore finale all'acquisto. Il tessuto vegetale è da considerare vivo a tutti gli effetti, e il livello di respirazione nei prodotti tagliati è maggiore rispetto ai corrispondenti vegetali integri, inoltre la presenza dei tagli influisce sulla produzione di etilene accelerando i processi di invecchiamento. Il confezionamento dei prodotti ortofrutticoli di IV gamma, generalmente in buste termosigillate o vaschette (Fig.13),

è effettuato in atmosfera modificata (ATM) da molti produttori allo scopo di prolungarne il mantenimento della qualità. Questa tecnologia consiste nell'introduzione, all'interno delle confezioni, di miscele di gas ( $\text{CO}_2/\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2/\text{N}_2$ ) in proporzioni diverse rispetto alle normali concentrazioni atmosferiche visto che un elevato tenore di  $\text{CO}_2$  è utile per evitare l'insorgenza di processi ossidativi nelle insalate di IV gamma (Tab. 2). Per ottenere un prodotto finito di qualità, è di fondamentale importanza partire da una materia prima di buona qualità, di conseguenza è essenziale procedere a un'attenta valutazione dei fornitori, inoltre è di fondamentale importanza la predisposizione di un piano di pulizia e disinfezione di macchinari, attrezzature e ambiente allo scopo di evitare *cross-contaminazioni* in fase di lavorazione.

**Tab. 2** Percentuale residua di  $\text{O}_2$  tollerata nelle confezioni di prodotti vegetali di IV gamma.

Rischio di ossidazione	Tipologia di prodotto	% di $\text{O}_2$ residua tollerata
<b>ELEVATO</b>	Cuori di Lattuga, Cuori di Iceberg, Cuori di Scarola	4-6.5%
<b>MEDIO</b>	Insalate miste adulte	7-9.5%
<b>BASSO</b>	Lattughino, misticanze " <i>Baby leaf</i> "	9-12.5%
<b>NULLO</b>	Rucola, Valeriana, Spinaci, Carote	20-21%

**Fig.7, Fig. 8** Fase di lavaggio dei Vegetali di IV gamma



Fig.9, Fig. 10 Fase di lavaggio dei Vegetali di IV gamma

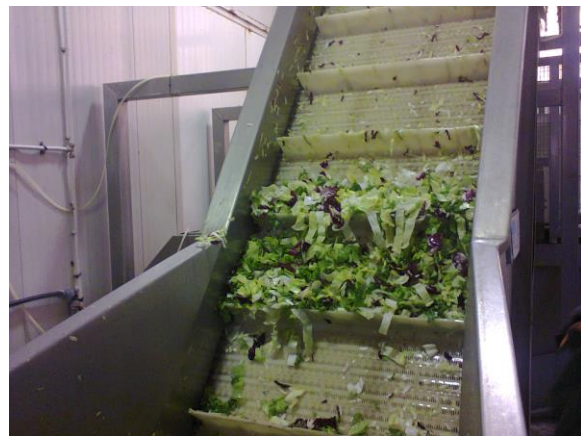


Fig. 11 Fase di asciugatura dei Vegetali di IV gamma

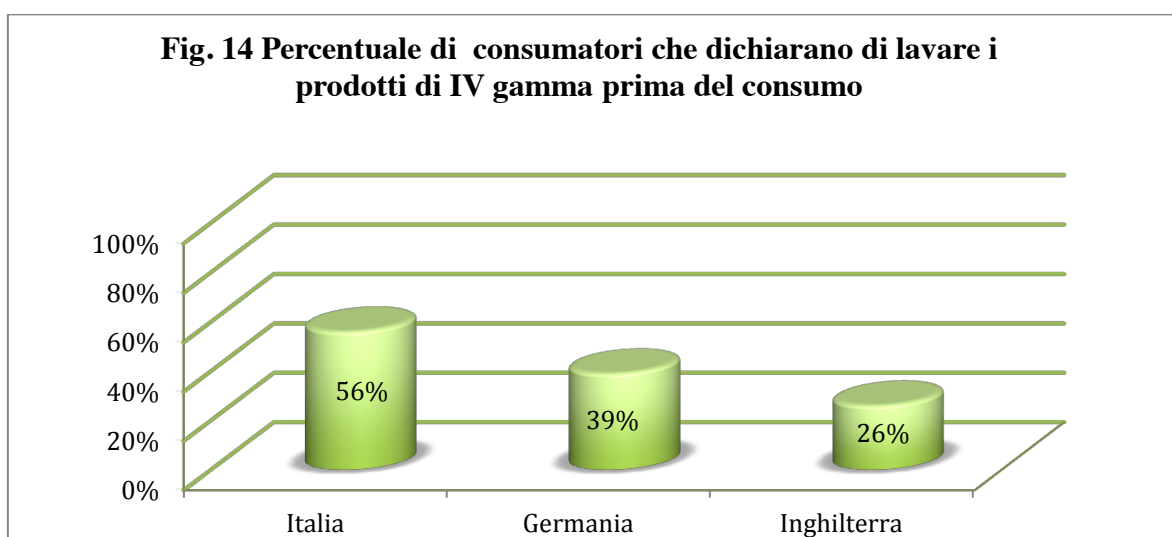


Fig. 12A, Fig. 12B Fase di confezionamento dei Vegetali di IV gamma



### 1.7 Modelli di consumo dei vegetali di IV gamma

Il differente comportamento dei consumatori europei nella scelta e acquisto dei prodotti di IV gamma è stato evidenziato da una recente indagine Nomisma (9) in cui è emerso come il consumatore italiano sia maggiormente predisposto all'acquisto di prodotti di IV gamma nel caso in cui la marca e il produttore siano noti (22%), mentre i consumatori inglesi e tedeschi non sono influenzati da tale fattore. Altri incentivi all'acquisto sono rappresentati dal prezzo del singolo prodotto: il 14% degli intervistati dichiara di acquistare i prodotti di IV gamma a basso costo, mentre il 16% acquista quelli in offerta. In ogni caso la scelta dei prodotti di IV gamma è sempre dettata dalla praticità al consumo e infatti il 79% degli italiani dichiara di consumarli in pausa pranzo. Per quanto concerne le modalità di utilizzo dei prodotti di IV gamma, lo studio ha evidenziato come la maggioranza dei consumatori italiani (56%) siano soliti rilavare le insalate in busta prima di consumarle (Fig.14).



## CAPITOLO 2

### 2.1 Epidemiologia.

Il RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) ha più volte richiamato l'attenzione dei Paesi Membri riguardo il pericolo microbiologico correlato al consumo di vegetali di IV gamma. Nel corso del 2014 sono state trasmesse 3097 notifiche di cui 506 di provenienza italiana (38). E' stato evidenziato come le principali segnalazioni riferite a contaminazioni batteriche (principalmente da *Salmonella* spp.) dei prodotti di origine vegetale abbiano riguardato principalmente la rucola e le insalate miste da foglia e da taglio (39, 40, 41).

Sulla base dei dati contenuti nella relazione dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare, relativo al monitoraggio delle zoonosi registrate nel 2013, emerge come le tossinfezioni da *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC), in Europa, siano in aumento dal 2008, con un raddoppiamento delle segnalazioni nel 2011 rispetto all'anno precedente a causa di un'epidemia associata al consumo di germogli di fieno che ha portato al decesso di 56 persone (Germania, Danimarca, Francia e Paesi Bassi 2011). Nel corso del 2013 sono stati registrati tre *outbreaks* da *E. coli* VTEC associati al consumo di insalate pronte al consumo sia in Svezia che nel Regno Unito. Il rischio di tossinfezioni alimentari associate al consumo di vegetali è riconducibile alla presenza nell'alimento di *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp.) e di patogeni psicrofilici come *Listeria monocytogenes*. Casi di Salmonellosi sono stati associati al consumo di "Baby leaf" (Finlandia 2013), rucola (Norvegia, 2004) e spinaci (Svezia, 2007). Sono stati inoltre segnalati 21 casi infezioni da *Yersinia* spp. associate al consumo di vegetali di IV gamma (Norvegia 2010). Anche le listeriosi umane associate al consumo di alimenti *ready to eat* risultano in aumento: nel 2013 è stata segnalata un'epidemia di listeriosi in Germania, associata al consumo di insalata mista, che ha causato il decesso di una persona (42).

I dati del CDC (Centre for Disease Control and Prevention), confermano *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e i ceppi di *E. coli* produttori di tossina (O104:H4, O157:H7, O121, O26, O154) come maggiori agenti patogeni di infezioni alimentari associate ai prodotti vegetali di IV gamma (insalate miste e germogli). Il sistema di allerta rapido RASFF è lo strumento, a disposizione delle autorità degli Stati Membri dell'Unione Europea che operano nell'ambito della Sicurezza Alimentare, che consente di notificare in tempo reale i rischi per la salute pubblica associati ad

alimenti, mangimi e materiali a contatto con gli alimenti. Permette agli operatori del settore alimentare (OSA) di compiere interventi rapidi e coordinati volti al ritiro dei lotti pericolosi, grazie all'attivazione degli organi territoriali competenti. In caso di prodotti potenzialmente pericolosi per la salute, gli Stati membri e la Commissione europea vengono immediatamente attivati per garantire il ritiro del prodotto ed assicurare la corretta informazione dei consumatori.

## **2.2 Aspetti microbiologici dei prodotti vegetali di IV gamma**

### **2.2.1 Origine della contaminazione**

La contaminazione microbiologica degli alimenti rappresenta sempre un evento indesiderato sia a causa delle ripercussioni sulla salute dei consumatori, sia per l'attività alterante dei microrganismi. Gli alimenti possono essere contaminati in differenti modi durante il processo produttivo: la contaminazione può, infatti, essere già avvenuta nella materia prima, ad esempio negli alimenti di origine vegetale attraverso l'utilizzo di acque irrigue od fertilizzanti contaminati.

La manipolazione degli alimenti da parte di soggetti portatori, un'insufficiente igiene del personale, il contatto con superfici di lavoro o utensili non adeguatamente sanificati, l'uso di acqua non potabile, la presenza di ambienti di lavorazione non adeguatamente protetti da contaminazioni animali, la carenza di disegni igienici e di percorsi di separazione in fase di lavorazione rappresentano le principali modalità di rischio di contaminazione dei prodotti alimentari. È fondamentale, inoltre, proteggere gli alimenti (materie prime e prodotti trasformati) dall'esposizione a insetti, roditori e altri animali.

I livelli di contaminazione microbiologica dei prodotti vegetali di IV gamma sono strettamente correlati alla qualità della materia prima, al rispetto delle buone norme di lavorazione in corso di produzione, alle fasi di movimentazione dei prodotti, al loro stoccaggio e trasporto fino al consumatore finale.

L'origine della contaminazione è di difficile individuazione anche se riconducibile principalmente all'acqua d'irrigazione, alla tipologia di concimazione, al personale addetto alla produzione e confezionamento e alla non corretta sanificazione delle attrezzature e superfici destinate a venire in contatto con l'alimento. È necessario controllare e impedire l'accesso di animali selvatici alle zone adibite alle colture e alle riserve d'acqua allo scopo di evitare contaminazioni da parassiti e microrganismi potenzialmente dannosi (44).

Il contenuto di nutrienti, l'elevata percentuale di acqua (88%) in gran parte disponibile (visto il basso tenore di carboidrati 8.6% e grassi 0.3%), e i valori di pH, fanno sì che i prodotti vegetali rappresentino dei substrati capaci di supportare la crescita di muffe, batteri e lieviti.

La microflora, principalmente di origine ambientale, non differisce da quella della materia prima costituita per lo più da batteri Gram negativi caratterizzati da un elevato grado di psicrotrofia come *Pseudomonadaceae* ed *Enterobacteriaceae*.(45).

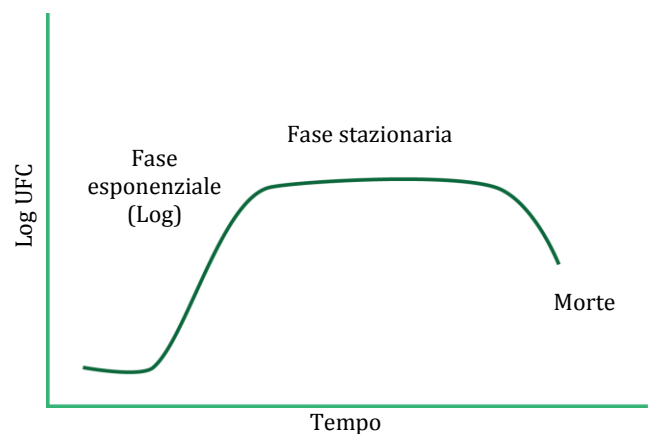
### 2.2.2 Condizioni ecologiche favorevoli per la duplicazione della cellula batterica negli alimenti

Nel momento in cui i microrganismi si trovano in condizioni favorevoli per la loro moltiplicazione (temperatura, pH,  $A_w$ , potenziale *redox*), avviene un incremento del processo riproduttivo: in condizioni ottimali, la moltiplicazione batterica, presenta un andamento che, seppur variabile in base alla specie, può essere schematizzato attraverso il grafico della “curva di crescita” (Fig. 15) (43).

#### Temperatura

L'attività metabolica dei microrganismi varia in funzione della temperatura dell'ambiente in cui essi si trovano, di conseguenza per ogni singola specie è possibile identificare una temperatura minima, ottimale e massima di crescita .

Fig. 15 Curva di crescita batterica



#### $A_w$ , Attività dell' acqua

L'acqua necessaria per lo svolgimento delle normali reazioni metaboliche dei microrganismi è in realtà una porzione della quantità di acqua effettivamente presente all'interno dell'alimento, rappresentata dalla porzione libera, non legata ed espressa dal rapporto  $P/P_o$ , tra la pressione di vapore del solvente alla superficie dell' alimento (P) e quella dell' acqua allo stato puro ( $P_o$ ).



### **Concentrazione idrogenionica o pH**

I batteri si moltiplicano entro un *range* di pH piuttosto ampio (4.5-9) con *optimum* di crescita intorno alla neutralità (6.5-7.5). Fanno eccezione nei batteri lattici (*Lactobacillus*), acetici (*Acetobacter*), i lieviti (*Saccharomyces*), i funghi (*Penicillium, Aspergillus*), che tollerano pH inferiori a 4.5 (fino a 1.6). In relazione al pH, i batteri vengono suddivisi in: acidofili, eutrofilo, basofili. Oltre alla moltiplicazione microbica, il pH influenza la capacità di produrre tossine, la termoresistenza delle spore e dei microrganismi e l'attivazione della spora stessa.

### **Potenziale redox e disponibilità di O<sub>2</sub>**

In relazione all'utilizzo o meno dell'ossigeno come ultimo accettore di H<sup>+</sup> nei processi respiratori di produzione energetica dei microrganismi, questi possono essere classificati in: aerobi, anaerobi, aerobi-anaerobi facoltativi, microaerofili.

I microrganismi aerobi possiedono enzimi, quali la catalasi (CAT) e la superossido dismutasi (SOD), appartenenti alla classe delle ossido reduttasi, in grado di contrastare prodotti tossici quali superossidi (O<sub>2</sub>) e acqua ossigenata.

I microrganismi anaerobi non possiedono tali enzimi e ricavano l'energia per il loro sviluppo da processi fermentativi, utilizzando come accettori finali di H<sup>+</sup> altre sostanze; per questi microrganismi l'ossigeno è tossico.

I microrganismi anaerobi e anaerobi facoltativi possono ricavare l'energia in entrambi i modi e, dunque, possono svilupparsi sia in assenza sia in presenza di ossigeno (*E.coli*), mentre i microrganismi microaerofili tollerano la presenza di piccole quantità di ossigeno. Il potenziale di ossido riduzione può essere definito come la capacità di un substrato di perdere o accettare elettroni. Il loro passaggio crea una differenza di potenziale esprimibile in *millivolt* (mV), espressa con il simbolo Eh. Si intuisce come il potenziale *redox* di un alimento condizioni lo sviluppo microbico, permettendo in alcune parti lo sviluppo degli aerobi e degli aerobi facoltativi (in superficie) e in altre parti lo sviluppo degli anaerobi stretti e degli anaerobi moderati, oppure dei microaerofili.

## **Nutrimiento**

I microrganismi, per sopravvivere e svilupparsi, hanno bisogno di principi nutritivi per il metabolismo plastico ed energetico: gli alimenti, in particolare quelli di origine animale, presentano un'acomposizione chimica che permette lo sviluppo di quasi tutti i microrganismi, di conseguenza possono essere considerati dei veri e propri ecosistemi.

### **2.3 Il rischio alimentare**

La probabilità che un pericolo biologico provochi un danno all'ospite, è definita come rischio e questo risulta associato ad alcuni presupposti:

- che il microrganismo patogeno contaminino l' alimento destinato al consumatore;
- che il microrganismo patogeno sopravviva fino al momento di ingestione dell' alimento;
- che si moltiplichi fino a raggiungere nell' alimento livelli capaci di determinare un' infezione o portare alla produzione di tossina;
- che sopravviva durante il passaggio nell' ambiente acido dello stomaco (effetto protettivo degli alimenti, meccanismi adattativi di acido tolleranza);
- che la persona che lo consuma sia sensibile alle dosi; che abbia capacità invasiva e di diffusione delle tossine prodotte e sia in grado di competere con la microflora del tratto intestinale.

Maggiore è la quantità di alimento contaminato ingerito, maggiore sarà la probabilità di sviluppare la malattia, in alcuni casi però sono sufficienti piccolissime porzioni di alimento per determinare l'insorgenza di alcune intossicazioni.

### **2.4 Tossinfezioni alimentari**

Le "tossinfezioni alimentari" sono rappresentate dall'insieme di malattie associate all'ingestione di alimenti contaminati da microrganismi potenzialmente patogeni e/o tossine prodotte dal loro metabolismo; più precisamente sono suddivise in:

- infezioni alimentari;
- intossicazioni alimentari;
- tossinfezioni alimentari propriamente dette.

### **Infezioni alimentari**

L'alimento ingerito deve essere contaminato con il patogeno che, una volta superata la barriera gastrica arriva nell'intestino, dove può aderire alla mucosa e duplicarsi

oppure, addentrarsi nella sottomucosa e passare in circolo, determinando batteriemia o setticemia. In alcuni casi il danno è determinato dalla biosintesi di esotossine ed endotossine capaci di agire in loco o a livello di altri organi o apparati. Il processo di infezione giustifica il lungo periodo d'incubazione di queste forme (non meno di 12-24 ore e fino a 7-9 giorni), come nel caso di infezioni da *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli verocitotossici* (VTEC), *Vibrio spp.*, *Shigella spp.*, *Listeria monocytogenes*.

### **Intossicazioni alimentari**

L'alimento è contaminato da microrganismi capaci di duplicarsi attivamente nell'alimento e di liberare le tossine nell'alimento (ceppi enterotossici di *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*) o accumularle in vacuoli del citoplasma, per liberarle come protossine a livello gastrico al momento della digestione. Nelle intossicazioni il periodo d'incubazione è molto ridotto, variabile da meno di 4 ore (*S. aureus*) fino a 8 giorni (*C. botulinum*), in quanto la tossina risulta già preformata nell'alimento e non necessariamente il microrganismo è ancora presente.

### **Tossinfezioni alimentari propriamente dette**

Nelle tossinfezioni alimentari, il microrganismo deve contaminare l'alimento e proliferare attivamente per raggiungere cariche infettanti ( $>10^4$ - $10^6$  UFC/g o mL). Il microrganismo contenente la tossina preformata nel citoplasma o le endotossine deve disgregarsi nello stomaco o arrivare a colonizzare la mucosa enterica. Il periodo d'incubazione delle tossinfezioni è intermedio tra quello delle infezioni e quello delle intossicazioni (tra 12 e 48 ore). Esempi tipici di tossinfezioni alimentari sono quelle da *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*.

## **2.5 Colonizzazione batterica dei vegetali**

Le piante risultano colonizzate da una microflora costituita da batteri, lieviti e funghi filamentosi. I batteri, presenti in quantità numericamente maggiori rispetto agli altri microrganismi, tendono a localizzarsi principalmente a livello delle foglie, dove possono essere raggiunti valori di contaminazione pari a  $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup>. Nella foglia l'umidità emessa attraverso gli stomi è generalmente captata a favore del metabolismo cellulare batterico. Molte specie batteriche mostrano la capacità di aderire alle superfici vegetali attraverso la formazione di *biofilm* (Fig.16, Fig. 17). I *biofilms*

batterici rappresentano un sistema biologico a elevato grado di organizzazione in cui i batteri, sono organizzati e strutturati all'interno di una comunità funzionale che ne permette la sopravvivenza anche in condizioni di forte stress come essiccamento e presenza di ossigeno o perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). Il *biofilm* risulta costituito essenzialmente dalla matrice polisaccaridica batterica, acqua e dai microrganismi stessi che utilizzano questa struttura anche per migrare sulla superficie della pianta in cerca di nutrimenti (47, 48). Ai generi *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Pectobacterium* appartengono alcuni tra i più diffusi agenti batterici responsabili delle alterazioni qualitative dei prodotti vegetali, indicate genericamente come “marciume molle batterico”. L'insorgenza di tali fenomeni degenerativi è resa più precoce nei prodotti vegetali di IV gamma dal tipo di lavorazione: i tagli effettuati in fase di produzione determinano la distruzione della barriera esterna del tessuto vegetale e facilitano la penetrazione della flora alterante. Una volta che il processo di alterazione ha avuto inizio, comincia il coinvolgimento di altre specie batteriche. Il processo degradativo terminerà solo con la completa distruzione del tessuto vegetale, che determinerà la formazione di composti volatili ( $NH_3$ , acidi volatili e simili) dai caratteristici odori sgradevoli (45).

Fig. 16 Adesione di patogeni enterici a foglie di insalata fresca (48)

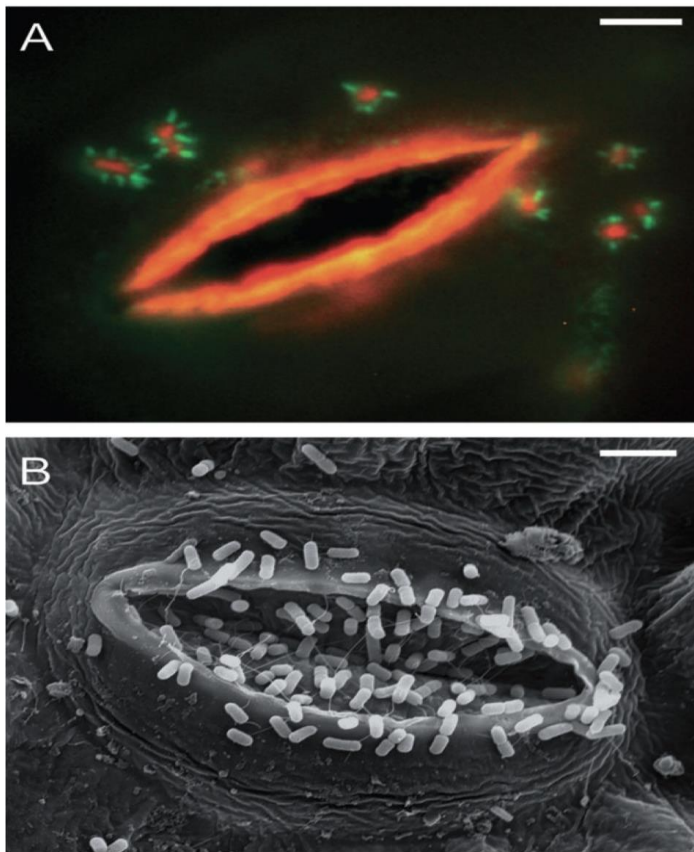
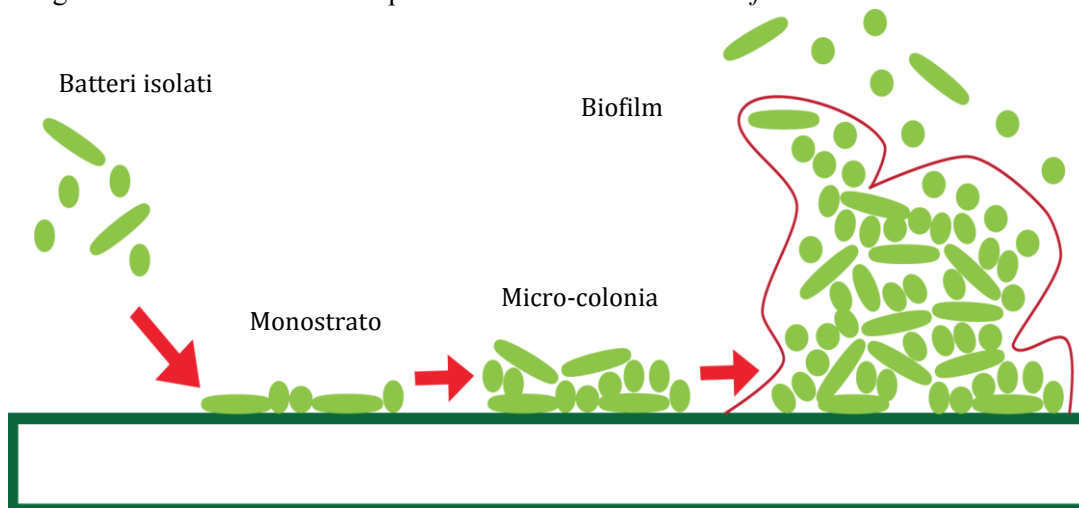


Fig. 17 Schematizzazione del processo di formazione del *Biofilm*



### 2.5.1 Microrganismi patogeni

I principali microrganismi patogeni associati al consumo di prodotti ortofrutticoli di IV gamma (Tab.3) appartengono alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (*E. coli* produttori di tossina, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*). Inoltre *Listeria monocytogenes*, microrganismi ambientali come *Aeromonas hydrophila*, agenti virali (*Norovirus* e Virus dell'epatite A (HAV), *Rotavirus*, ed *Astrovirus*) e protozoi possono contaminare il prodotto. La potenzialità del danno che deriva da un'infezione dipende dalla virulenza dell'agente patogeno, dalla carica infettante, da fattori ambientali e dalle caratteristiche di resistenza dell'ospite (50,51, 52, 53, 54, 55, 56, 57,58).

**Tab. 3 Principali patogeni associati al consumo di prodotti ortofrutticoli di IV gamma**

<b>Agente eziologico</b>	Escherichia coli ceppi virulenti a) Enteropatogeni <i>E. coli</i> (EPEC). b) Enterotossigeni <i>E. coli</i> (ETEC), c) Enteroinvasivi <i>E. coli</i> (EIEC). d) Enteroemorragici <i>E. coli</i> (EHEC) comprendenti i ceppi verocitotossici (VTEC), anche indicati come Shiga-toxin producing <i>E. coli</i> (STEC). Tra questi, il sierotipo maggiormente isolato è <i>E. coli</i> O157:H7
<b>Caratteristiche</b>	Gram-negativi, asporigeni. Tipicamente mesofili con un optimum di temperatura di 37°C, mostrano un <i>range</i> di temperatura molto vasto (7-10 °C sino 50 °C). Valore minimo di $a_w$ di 0.95, pH 4.4-8.5.
<b>Periodo di incubazione</b>	a) EPEC: 1-6 giorni; b) ETEC, EIEC: 1-3 giorni; d) EHEC: 3-8 giorni,
<b>Sintomi</b>	a) EPEC aderiscono alla mucosa intestinale e cambia la sua capacità di assorbimento, causando vomito, diarrea, dolore addominale e febbre. b) ETEC produzione di enterotossine. Diarrea, crampi addominali, vomito c) EIEC capaci di penetrare la mucosa intestinale determinano l'insorgenza di una malattia di tipo infiammatorio della mucosa e sottomucosa. Febbre, forti dolori addominali, vomito, diarrea acquosa e talvolta sanguinolenta. d) EHEC crampi addominali e diarrea acquosa che possono evolvere in diarrea ematica (colite emorragica). Possono verificarsi anche febbre e vomito
<b>Sequela</b>	Le infezioni da EHEC possono provocare complicanze potenzialmente letali come la sindrome emolitica uremica (HUS) caratterizzata da insufficienza renale acuta, anemia emolitica e trombocitopenia
<b>Durata</b>	a) EPEC, EIEC, EHEC: settimane o giorni. b) ETEC: Più di 5 giorni
<b>Agente eziologico</b>	<i>Listeria monocytogenes</i> .
<b>Caratteristiche</b>	Gram-positivo, asporigeno. Microrganismo psicrofilo, cresce a temperature comprese tra 3-42 °C (optimum 30-35 °C), pH 5.0-9.0 (minimo 4.4), $a_w > 0.92$ .
<b>Periodo di incubazione</b>	Giorni o alcune settimane.
<b>Sintomi</b>	Sintomi simil-influenzali, mal di testa e occasionalmente sintomi gastrointestinali
<b>Sequela</b>	Meningoencefalite e/o setticemia nei neonati e negli adulti e aborto nelle donne in gravidanza. L'insorgenza di meningoencefalite può essere improvvisa, con febbre, mal di testa intenso, nausea, vomito e segni di irritazione meningea.
<b>Durata</b>	Settimane- giorni
<b>Agente eziologico</b>	<i>Salmonella</i> spp..

<b>Caratteristiche</b>	Gram-negativo, mesofilo, anaerobio facoltativo, mobile, asporigeno. Cresce a temperature comprese tra 5-47 °C (optimum 37 °C), pH >4.0 e $a_w$ >0.95.
<b>Periodo di incubazione</b>	6–48 ore, occasionalmente maggiore di 4 giorni.
<b>Sintomi</b>	Febbre, mal di testa, nausea, vomito, dolori addominali e diarrea
<b>Sequela</b>	Artrite reattiva, setticemia, aortite, colecistite, colite, meningite, miocardite, osteomielite, pancreatite, malattia di Reiter, sindromi reumatoidi
<b>Durata</b>	Alcuni giorni: 1-3 settimane.
<b>Altri commenti</b>	L'entità della malattia è legata al sierotipo.

<b>Agente eziologico</b>	<i>Yersinia enterocolitica.</i>
<b>Caratteristiche</b>	Gram-negativo, anaerobio facoltativo, asporigeno, psicrofilo. Cresce a temperature comprese tra 0-44 °C (optimum 29 °C), e pH 4.6-9.0 (optimum pH 7-8).
<b>Periodo di incubazione</b>	24-36 ore.
<b>Sintomi</b>	Dolori addominali, diarrea, febbre lieve e talvolta vomito.
<b>Sequela</b>	Insorgono molto raramente.
<b>Durata</b>	2-3 giorni, con un massimo di 1-3 settimane.
<b>Altri commenti</b>	Casi non trattati possono continuare a espellere gli organismi per 2-3 mesi. La malattia è spesso mal diagnosticata come appendicite. Raramente è fatale.

<b>Agente eziologico</b>	<i>Listeria monocytogenes.</i>
<b>Caratteristiche</b>	Gram-positivo, asporigeno. Microrganismo psicrofilo, cresce a temperature comprese tra 3-42 °C (optimum 30-35 °C), pH 5.0-9.0 (minimo 4.4), $a_w$ >0.92.
<b>Periodo di incubazione</b>	Giorni o alcune settimane.
<b>Sintomi</b>	Sintomi simil-influenzali, mal di testa e occasionalmente sintomi gastrointestinali
<b>Sequela</b>	Meningoencefalite e/o setticemia nei neonati e negli adulti e aborto nelle donne in gravidanza. L'insorgenza di meningoencefalite può essere improvvisa, con febbre, mal di testa intenso, nausea, vomito e segni di irritazione meningea.
<b>Durata</b>	Settimane- giorni
<b>Altri commenti</b>	La forma più grave si verifica in individui immunocompromessi. L'infezione fetale transplacentare può portare ad aborto o parto prematuro. L'infezione asintomatica può verificarsi a tutte le età. Mortalità fino al 30%, e fino al 70% in pazienti non trattati adeguatamente.

<b>Agente eziologico</b>	<i>Aeromonas hydrophila.</i>
<b>Caratteristiche</b>	Gram-negativo, mobile, asporigeno, anaerobio facoltativo: optimum di temperatura a 4°C), pH 4.0-10.0
<b>Periodo di incubazione</b>	24-48 ore.
<b>Sintomi</b>	Feci acquose, crampi addominali, febbre e vomito.
<b>Sequela</b>	Broncopolmoniti e colecistiti
<b>Durata</b>	Settimane- giorni
<b>Altri commenti</b>	Patogeno opportunisto

Agente eziologico	<b>Virus dell'epatite A (HAV)</b>
Caratteristiche	Virus di forma rotondeggiante di circa 28nm di diametro, appartenente ai <i>Picornaviridae</i> , genoma a RNA a singolo filamento. Replica a livello dell'epitelio intestinale prima di passare al fegato. Il virus, eliminato con le feci, è relativamente resistente agli acidi.
Periodo di incubazione	25-28 giorni (range 2-6 settimane).
Sintomi	Perdita di appetito, febbre, malessere generale, dolori addominali, nausea e vomito seguiti da danno epatico (urine scure, feci chiare, ittero)
Sequela	Insufficienza epatica acuta, specialmente negli anziani
Durata	Varia in funzione del quadro clinico
Altri commenti	Mortalità di circa 0.3%, il tasso aumenta negli individui sopra i 50 anni

### ***Escherichia coli* O157:H7**

*Escherichia coli* comprende oltre 171 sierotipi, caratterizzati dalle differenti combinazioni degli antigeni O, K, H e F (59). Il sierogruppo O157:H7 appartiene al gruppo degli *Escherichia coli* enteroemorragici (EHEC), più precisamente ai verocitotossici (VTEC), caratterizzato dalla capacità di resistere alle basse temperature, dalla mancata capacità di fermentare il sorbitolo e negatività alla prova dell'idrolisi del MUG (4-metilumbelliferil-beta-D-glucuronide); *E. coli* O157:H7 è sensibile al blu di bromotimolo ad alte temperature (44-45°C).

La patogenicità di *E. coli* O157:H7 è riconducibile, oltre alla produzione delle due tossine *Shiga-like* (Stx1, Stx2), alla presenza di un plasmide di 60MDa che codifica per fattori di virulenza quali fimbrie ed enteroemolisine e dalla produzione di *intimina*, una proteina di 97KDa codificata dal gene *eaeA*, responsabile dell'adesività del batterio alle cellule epiteliali dell'intestino e loro successiva distruzione. Le tossine *Shiga-like*, codificate dai geni *sxt1* e *sxt2*, sono molto simili alle tossine prodotte da *Shigella* spp.: da un punto di vista strutturale sono costituite da due subunità A (*active*) e da cinque subunità B (*binding*). Le subunità B si legano al recettore presente sulla superficie degli enterociti promuovendo l'internalizzazione della subunità A che si lega a sua volta al frammento di RNA ribosomiale 28s bloccando la sintesi proteica. La distruzione degli enterociti, accompagnata da una diminuzione della capacità di assorbimento, comporta l'insorgenza di una diarrea molto liquida e sanguinolenta. Successivamente le tossine Stx, prodotte localmente dai batteri, vengono adsorbite in circolo, dove aderiscono alla superficie dei neutrofilo e sono veicolate sino al rene. Alcuni recettori delle cellule endoteliali renali presentano un'affinità per le Stx 100 volte superiore a quella dei recettori presenti sui neutrofilo, perciò le Stx, dopo internalizzazione, sono in grado di provocare lesioni alle cellule endoteliali renali,



determinando l'insorgenza dalla sindrome emolitico-uremica (HUS), e della conseguente insufficienza renale acuta. Oltre a ciò, la tossina stimola la produzione di sostanze pro-infiammatorie (TNF-alfa, interleuchina-6, citochine) (60).

### ***Listeria monocytogenes***

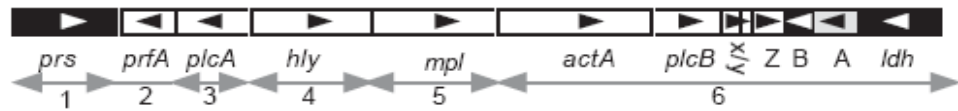
*Listeria monocytogenes*, ha la capacità di sopravvivere in ambienti umidi per lunghi periodi di tempo senza una significativa diminuzione della carica microbica. Tale caratteristica, unitamente alla capacità di aderire a qualsiasi superficie tramite la formazione di *biofilm*, porta il batterio ad essere particolarmente predisposto alla sopravvivenza in condizioni sfavorevoli (61). La classificazione sierologica di *L. monocytogenes* è basata sulla presenza di 15 antigeni somatici O di natura polisaccaridica (da 1 a 15) e 4 antigeni flagellari H di natura proteica (A, B, C, D): si riconoscono quindi 4 sierogruppi (1,3,4 e 7) e 13 sierotipi (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 7). I sierotipi più comunemente associati ad infezioni umane sono 1/2a, 1/2b e 4b, in particolare il sierotipo 4b rappresenta quello più frequentemente associato a focolai epidemici. Nonostante l'optimum di temperatura sia compreso tra i 30°C ed i 37°C, è in grado di sopravvivere e replicarsi a temperature di refrigerazione (4°C) (62). Il tratto gastrointestinale rappresenta il sito primario di ingresso di *L. monocytogenes* nell'ospite. Grazie alla produzione di internaline InlB, InlC e InlJ è in grado di aderire e invadere l'epitelio intestinale (63). *L. monocytogenes* riesce ad attraversare la mucosa intestinale sia attraverso l'invasione diretta degli enterociti, che per mezzo del fenomeno di traslocazione mediato dalle cellule M delle placche del Peyer. Una volta superata la barriera intestinale, *L.monocytogenes* raggiunge i linfonodi mesenterici e da qui per via linfoematogena può raggiungere i principali organi bersaglio (64, 65).

I più importanti fattori di virulenza di *L. monocytogenes*(66) sono localizzati in un unico cluster (Fig.14) di 9 kb chiamato *PathogenicityIsland-1* (LIPI-1 o *prfA* cluster), localizzato tra i geni *housekeepingprs* (*phosphoribosyl synthetase*) e *ldh* (*lactate dehydrogenase*).

Il fattore trascrizionale *prfA*, localizzato a monte del cluster LIPI-1, svolge un'azione di controllo positiva sulla trascrizione dei geni *hly* (codificante per una tossina formante pori, listeriolisina LLO), *plcA* e *plcB* (codificanti due fosfolipasi), *mpl* e *actA*. Le proteine codificate dai geni localizzati a livello del *cluster* LIPI-1 permettono la diffusione di *Listeria monocytogenes* da una cellula a un'altra.

*Listeria monocytogenes* presenta altri geni di virulenza non localizzati a livello del cluster LIPI-1 come, l'operone *inlAB* che codifica per le internaline A e B (*inlA*, *inlB*) e i monocistroni *inlC* e *hpt*, necessarie per l'invasione delle cellule dei mammiferi ed il gene *iap* codificante le proteine necessarie all'invasione cellulare.

Fig. 14 *PathogenicityIsland-1* di *Listeriamonocytogenes*



## CAPITOLO 3

### 3.1 Legislazione alimentare

Sulla base di sette principi (Tab. 4), il sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) permette l'individuazione dei rischi associati a ogni fase produttiva e l'identificazione delle possibili azioni preventive, di monitoraggio e correttive. Rappresenta lo strumento, a disposizione degli operatori del settore alimentare, per garantire la sicurezza alimentare attraverso l'analisi di tutte le fasi che compongono il processo produttivo. Nel

1	Individuare gli eventuali pericoli associati con la produzione, descrivendo le misure di controllo o prevenzione.
2	Identificare lungo la catena produttiva, dei punti critici (CP) che mantenuti sotto controllo siano in grado di prevenire, eliminare o ridurre il pericolo fino ai limiti accettabili.
3	Stabilire i criteri o limiti che devono essere dettati per assicurare che il punto critico sia sotto controllo (CCP).
4	Stabilire i sistemi di monitoraggio per valutare se i criteri stabiliti sono rispettati.
5	Stabilire le eventuali azioni correttive nel caso in cui il monitoraggio indichi che un determinato CCP non è più sotto controllo.
6	Stabilire le procedure per verificare che l'intero sistema HACCP abbia raggiunto gli obiettivi prefissati.
7	Documentare tutte le procedure adottate per l'esecuzione del piano HACCP.

Tab.4 I sette principi dell'HACCP

“Pacchetto igiene”, la responsabilità per la sicurezza degli alimenti viene affidata principalmente agli operatori del settore alimentare (OSA) che devono garantire la salubrità e la qualità igienico-sanitarie degli alimenti e tenere sotto controllo l'intero processo produttivo (44).

corso del 2004 sono stati emanati dall'Unione Europea, un gruppo di Regolamenti, che facendo seguito al Regolamento CE n.178/2002, aggiornano la normativa preesistente (comunitaria e dei singoli Stati) riguardante la sicurezza alimentare attraverso una sempre maggiore responsabilizzazione dei soggetti coinvolti, a partire dalla produzione primaria sino alla somministrazione. Il Pacchetto Igiene, costituito dall'insieme di regolamenti “chiave”, regolamenti “connessi” e regolamenti “applicativi” (Tab.5), rappresenta la logica prosecuzione del percorso legislativo già delineato nel Regolamento CE 178/2002, con le norme sull'igiene degli alimenti, riviste e unificate. Con l'entrata in vigore del

Tab. 5 Regolamenti di controllo igienico sanitario

	Chiave
	Regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio sull'igiene dei prodotti alimentari
	Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.
	Regolamento (CE) n. 854/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano.
	Regolamento (CE) n. 183/2005 del Parlamento Europeo e del Consiglio che stabilisce requisiti per l'igiene dei mangimi.
	Connessi
	Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali
	Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità Europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.
	Regolamento (CE) N. 1441/2007 della Commissione del 5 dicembre 2007 che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
	Applicativi
	Regolamento (CE) n. 2074/2005 della Commissione del 5 dicembre 2005 recante modalità di attuazione relative a taluni prodotti di cui al Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio e all'organizzazione di controlli ufficiali a norma dei Regolamenti del Parlamento Europeo e del Consiglio (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004, deroga al regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio e modifica dei regolamenti (CE) n. 853/2004 e (CE) n. 854/2004.
	Regolamento (CE) n. 2075/2005 della Commissione del 5 dicembre 2005 che definisce Norme specifiche applicabili ai controlli ufficiali relativi alla presenza di trichine nelle carni.
	Regolamento (CE) n. 2076/2005 della Commissione del 5 dicembre 2005 che fissa disposizioni transitorie per l'attuazione dei regolamenti del Parlamento Europeo e del Consiglio (CE) n. 853/2004, (ce) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004 e che modifica i regolamenti (CE) n. 853/2004 e (CE) n. 854/2004.

### 3.1.1 Prodotti ortofrutticoli

In particolare, per frutta e ortaggi pretagliati pronti al consumo, i criteri di sicurezza alimentare sono rappresentati da (67):

- *Salmonella* spp: deve essere assente in 25 g di prodotto nei prodotti campionati durante il periodo di conservabilità.

- *Listeria monocytogenes*, deve essere assente in 25g di prodotto per prodotti che devono ancora uscire dal sistema di controllo diretto del produttore; mentre l'unico criterio di igiene di processo previsto per la categoria alimentare considerata è rappresentato da:
- *Escherichia coli* i cui limiti sono identificati come segue, 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.

### **3.2 Shelf life di prodotti ortofrutticoli di IV gamma**

La Normativa attualmente in vigore in tema di sicurezza alimentare individua nell'Operatore del Settore Alimentare il principale responsabile del proprio processo produttivo, di conseguenza, egli è tenuto a valutare con metodi scientifici i pericoli per la salute legati al consumo dei propri prodotti. Sulla base del concetto del *risk analysis* l'Operatore del Settore Alimentare deve conoscere le caratteristiche chimiche, fisiche e microbiologiche ed i rischi associati alle proprie produzioni, allo scopo di comprendere meglio i cambiamenti a cui sono soggetti gli alimenti nel tempo, per poter stabilirne la durata e la corretta modalità di conservazione anche in situazioni limite rappresentative di alcune realtà distributive e domestiche. Con il termine *shelf lifes* intende l'intera vita commerciale dell'alimento dal momento della produzione sino al consumo o al raggiungimento della data di scadenza, periodo durante il quale il prodotto deve mantenere standard organolettici e di sicurezza accettabili (68). Durante il corso della *shelf life* il prodotto va inevitabilmente incontro a fenomeni di deperimento e invecchiamento a causa di reazioni enzimatiche e ossidative e dell'azione della flora batterica alterante. La valutazione della durata della *shelf life* è eseguita attraverso sperimentazioni che consistono nell'analisi periodica dei prodotti in esame, anche in considerazione delle situazioni di abuso termico (69).

Il Reg. (CE) 1441/2007 fornisce indicazione di uno strumento molto utile per l'esecuzione degli studi di *Shelf life*, in particolare per gli alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole per lo sviluppo di *Listeria monocytogenes*, prevedendo l'attuazione di *Challenge test*. I *challenge test* consistono in prove d'inoculazione sperimentale volte alla valutazione della capacità dell'alimento di supportare la crescita di un valutare il rispetto dei criteri di sicurezza, durante l'intera vita commerciale dei prodotti.

### 3.3 Challenge test

I *challenge test* sono prove sperimentali di laboratorio utilizzate per stabilire il comportamento dei microrganismi patogeni in un determinato alimento conservato nelle condizioni prescelte. In tale alimento si ricorre all'inoculazione di microrganismi e il prodotto è successivamente analizzato ad intervalli di tempo prestabiliti registrando i cambiamenti nella dinamica della popolazione batterica osservati durante il periodo di conservazione (70).

Vi sono diversi tipi di *challenge test* che riguardano la valutazione della sicurezza dei processi di produzione, delle condizioni di conservazione e della *shelflife* del prodotto. Attraverso i *challenge test* è possibile confermare che le misure adottate e i controlli effettuati in accordo con il piano di autocontrollo e l'applicazione del sistema HACCP siano realmente efficaci per contrastare il rischio di moltiplicazione microbica. I *challenge test* sono utilizzati anche per stimare l'efficacia degli inibitori di crescita e per stabilire la letalità associata a specifici trattamenti cui è sottoposto l'alimento durante il processo produttivo; i *challenge test* giocano un ruolo molto importante per quanto riguarda la valutazione della crescita di un patogeno nell'alimento, in condizioni simili a quelle di reale contaminazione durante la sua produzione (71). I *challenge test* permettono da un lato, lo studio delle caratteristiche chimico-fisiche del prodotto capaci di consentire la crescita di determinati tipi di microrganismi, dall'altro, lo studio della capacità di diversi microrganismi di crescere e di moltiplicarsi in un alimento con determinate peculiarità compositive e strutturali (72). La valutazione della curva di crescita batterica e dell'evoluzione delle cariche in funzione dei cambiamenti nella composizione dell'alimento, al tempo, alla temperatura di stoccaggio e alla tecnologia produttiva utilizzata permette di compiere un'attenta valutazione del rischio microbiologico.

L'articolo 3 del Regolamento (CE) 1441/07 prevede che, qualora si ritenesse necessario, gli operatori del settore alimentare, responsabili della fabbricazione del prodotto, come specificato dall'allegato II del sopracitato regolamento, possono effettuare "prove per determinare la capacità dei microrganismi in questione, debitamente inoculati, di svilupparsi o sopravvivere nel prodotto in diverse condizioni di conservazione ragionevolmente prevedibili", in modo da poter verificare se i criteri di valutazione microbiologica di igiene di processo e di sicurezza sono rispettati durante l'intera durata di conservabilità del prodotto. Ciò si applica specialmente agli alimenti RTE che costituiscono un terreno favorevole per la crescita di *L. monocytogenes* che possono rappresentare un rischio per la salute pubblica in quanto mezzo di diffusione di tale microrganismo (67).

La crescita del microrganismo nella matrice alimentare dipende da diversi fattori:

- Caratteristiche intrinseche ed estrinseche dell'alimento, come il pH, l' $A_w$ , il contenuto di NaCl, la presenza di conservanti, la microflora presente e le condizioni di confezionamento.
- Shelf-life del prodotto
- Numero di lotti
- Scelta del ceppo. I microrganismi utilizzati nel test sono rappresentati sia ceppi di controllo (ATCC) che da ceppi "selvaggi" (Wilde type) isolati nella stessa matrice alimentare o similari.
- Preparazione dell'inoculo. La scelta della concentrazione è molto importante in quanto valori troppo alti potrebbero portare a sovrastimare il rischio, al contrario valori troppo bassi potrebbero generare falsi-negativi. Il protocollo dell'AFSSA raccomanda una concentrazione di inoculo pari a circa 1000 UFC/g, valore comunemente usato nei *challenge test* perché permette una più agevole conta. Tuttavia una concentrazione compresa tra 1-10 si avvicina alle reali concentrazioni di *L. monocytogenes* rilevata in alimenti RTE a base di carne (73).
- Inoculazione, che deve avvenire riproducendo il più fedelmente possibile la contaminazione naturale. L'alimento verrà dunque contaminato in profondità in caso di cibi che devono essere omogenei o costituiti da diversi componenti (es. insalate miste), la contaminazione si effettuerà in superficie per riprodurre la contaminazione di una parte specifica durante il processo di produzione .
- Conservazione. Le condizioni di conservazione applicate durante il *challenge test* devono attenersi il più possibile alle condizioni cui realmente è sottoposto il prodotto (74, 75)

Lo studio, può essere eseguito su alimenti caratterizzati da una contaminazione naturale (nota) o contaminati artificialmente può essere allestito per valutare il processo produttivo (*Challenge test* di processo) o il comportamento batterico nel prodotto finito (*Challenge test* di prodotto) durante l'intera vita commerciale.

L'esecuzione degli studi di *Shelf life* e dei *Challenge test* è preceduta da una di pianificazione, nel corso della quale sono elaborate una serie di considerazioni riguardanti l'alimento oggetto del test. I fattori presi in esame riguardano il profilo microbiologico delle materie prime e del prodotto finito, il processo produttivo, l'identificazione microrganismi alteranti e di eventuali patogeni e la loro capacità di crescita nell'alimento.

## CAPITOLO 4

### 4.1 Indagini microbiologiche degli alimenti

Le tecniche microbiologiche tradizionali, utilizzate per la rilevazione di microrganismi in campioni alimentari e ambientali (superfici destinate a venire a contatto con gli alimenti, acqua e aria), ne permettono l'isolamento attraverso metodi qualitativi o quantitativi:

- *Metodi microbiologici quantitativi* (o enumerativi). L'enumerazione del numero dei microrganismi vitali, eventualmente presenti nel campione da analizzare, è valutata sulla base della capacità che ogni singola cellula ha di formare una colonia batterica su piastre Petri contenenti il terreno di coltura solido. Il risultato è espresso come unità formanti colonie (UFC), rapportate all'unità di misura utilizzate per definire la dimensione del campione analizzato: unità di peso (es. grammo) per gli alimenti, unità di superficie (es.  $\text{cm}^2$ ) per le superfici destinate a venire a contatto con gli alimenti, unità di volume per l'acqua (es. ml) e l'aria (es.  $\text{m}^3$ ).
- *Metodi microbiologici qualitativi* (presenza/assenza). Consistono nella classificazione del campione in esame sulla base dell'evidenza, oggettiva, della presenza o assenza del microrganismo ricercato nel campione di analisi. Il risultato in questo caso è espresso come presenza/assenza in rapporto all'unità di misura utilizzata per definire la dimensione del campione oggetto di analisi.

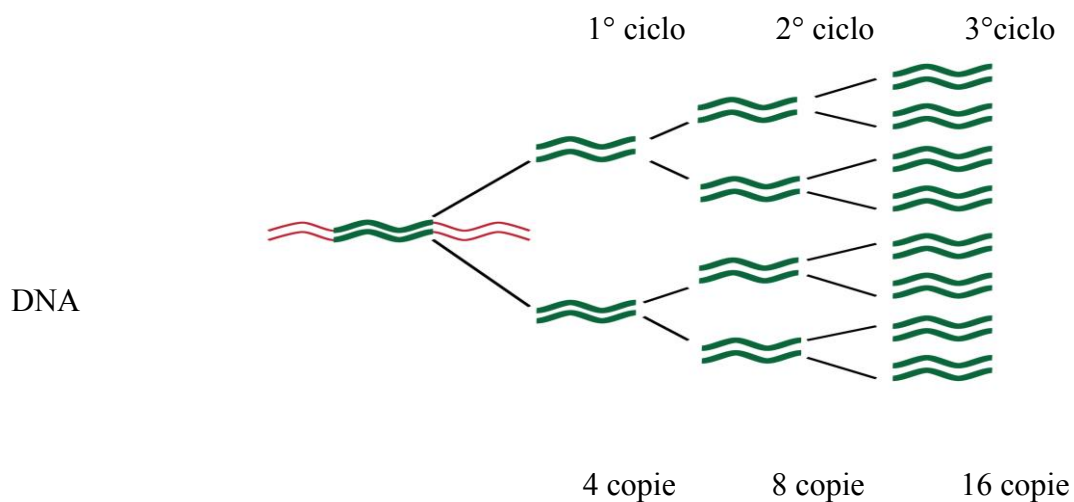
I metodi microbiologici qualitativi sono applicati per la ricerca di quei microrganismi patogeni presenti spesso in basse concentrazioni all'interno del campione, che difficilmente potrebbero essere individuati utilizzando procedure di conta diretta. Concettualmente le metodiche qualitative prevedono l'impiego di procedure di arricchimento del campione, seguite dalla semina su terreni di coltura selettivi e prove di conferma sulle colonie sospette (*tests* biochimici e sierologici) allo scopo di discriminare il microrganismo di interesse da forme microbiche strettamente correlate.



## 4.2 Tecniche di Biologia Molecolare

La reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) (76) è una delle metodiche più comunemente impiegate nei laboratori di Biologia Molecolare. La tecnica, messa a punto nel 1968 da Mullis, permette di ottenere in breve tempo milioni di molecole identiche di DNA da quantità molto ridotte (Fig.15), rendendo possibile la rilevazione di un microrganismo nel campione anche se presente a basse concentrazioni.

Fig. 15 Reazione a catena della polimerasi (PCR)



Perché la PCR possa avvenire, è necessario che nella provetta di reazione siano contenuti diversi elementi quali:

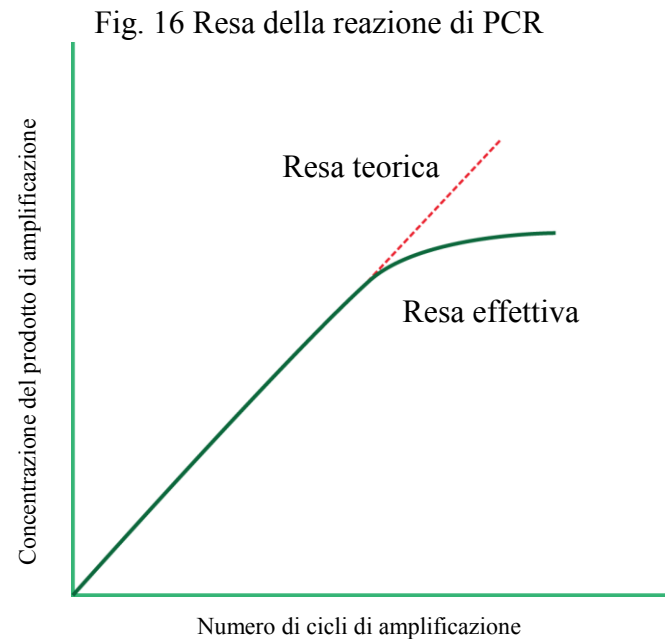
- Filamento di **DNA stampo** da amplificare.
- **DNA polimerasi** termostabile, che catalizza la sintesi del nuovo DNA.
- **Primers**, la coppia di oligonucleotidi sintetici complementari uno all'estremità 3' e l'altro all'estremità 5' del segmento di DNA che si vuole amplificare; costituiscono gli elementi di innesco dell'attività della DNA polimerasi.
- **Master mix**, il tampone di reazione contiene tra l'altro i desossiribonucleotidi (dNTP) necessari per la produzione dei nuovi filamenti di DNA.

La reazione consiste nel susseguirsi di cicli di amplificazione in cui si alternano tre differenti fasi caratterizzate da diversi range di temperatura:

1. **Denaturazione** della doppia elica di DNA stampo in due singole eliche (95°C).

2. **Appaiamento** dei *primers* alle sequenze complementari di DNA localizzate alle estremità del frammento bersaglio (50-70°C).
3. **Estensione** dei *primers* e formazione di nuove molecole di DNA complementari allo stampo (68-72°C).

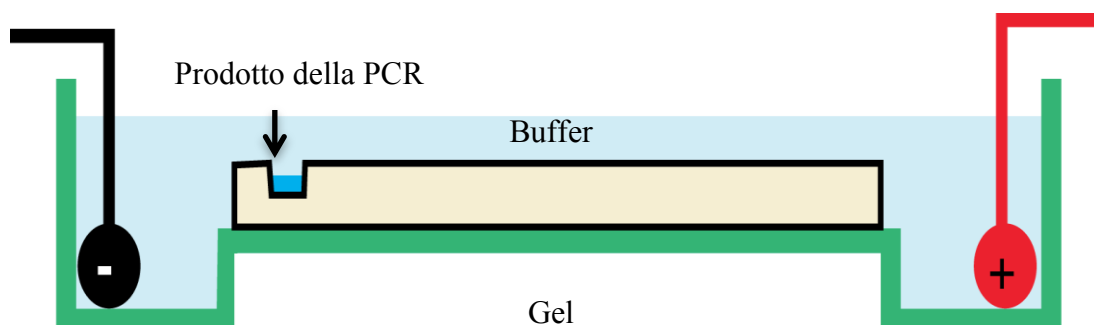
Il numero di cicli di amplificazione non è mai proporzionale alla concentrazione del DNA iniziale poiché nelle fasi finali dell'areazione si ha una diminuzione del prodotto. Svariati fattori, tra cui la degradazione dei reagenti, portano a un divario tra la resa teorica e la resa effettiva della PCR (*effetto plateau*) (Fig. 16).



#### 4.3 PCR end point

La metodica permette di eseguire solo analisi di tipo qualitativo. I frammenti di DNA, una volta amplificati, devono essere identificati attraverso una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% (contenente Bromuro di etidio) che permette la separazione delle molecole DNA sulla base del loro peso molecolare. L'elettroforesi è eseguita all'interno di una cella elettroforetica contenente una soluzione tampone in contatto con gli elettrodi (catodo e anodo). Le molecole di DNA, cariche negativamente migrano dal polo negativo verso quello positivo (Fig.17); terminata la corsa elettroforetica, la visualizzazione delle bande di DNA intrappolate all'interno della matrice del gel è effettuata sottoponendo il gel alla luce ultravioletta (254-306nm) attraverso l'ausilio di un transilluminatore. Il bromuro di etidio contenuto nel gel si intercala all'interno delle doppie eliche di DNA e, quando sottoposto alla luce ultravioletta emette fluorescenza.

Fig. 17 Elettroforesi su gel di agarosio



#### 4.4 Real time PCR

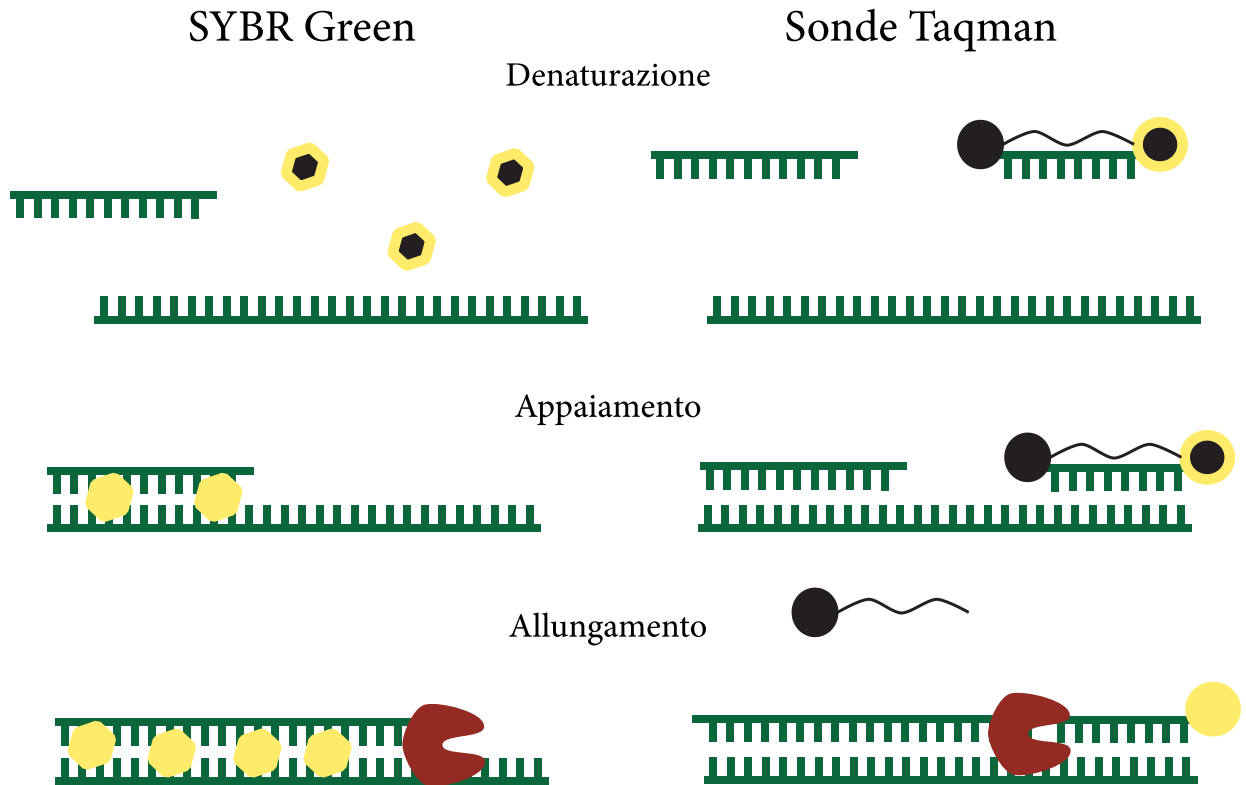
La *real time* PCR rappresenta un'evoluzione della PCR classica, a differenza della quale permette la rilevazione in tempo reale dei prodotti di amplificazione durante la fase esponenziale di accumulo del prodotto attraverso la rilevazione della fluorescenza prodotta: il livello di fluorescenza, registrato a ogni ciclo, è proporzionale alla quantità del prodotto di PCR. La fluorescenza è determinata dall'uso di coloranti che si legano al DNA in modo aspecifico o specifico (Fig. 18).

- **Coloranti aspecifici.** Sono molecole intercalanti fluorescenti (**SYBR Green**) la cui emissione è conseguenza del legame con il filamento di DNA di nuova produzione; solo dopo tale legame si ha l'aumento della fluorescenza (eccitazione 488 nm, emissione 530 nm), in proporzione alla quantità di amplificato ottenuto.
- **Coloranti specifici.** Sono rappresentati da sonde marcate con molecole fluorescenti, specifiche per la sequenza d'interesse. Le sonde **TaqMan**, generalmente più utilizzate, sono marcate con un fluorocromo a un'estremità e un colorante *quencher* all'altra. Il segnale di fluorescenza è emesso in seguito all'idrolisi della sonda, in seguito all'attività 5' esonucleasica della Taq polimerasi.

Indifferentemente dalla chimica utilizzata, la metodica permette di ottenere una curva di amplificazione in funzione del numero di cicli e del livello di fluorescenza registrato. Per ogni curva di amplificazione è fissata una linea soglia (**threshold**) allo scopo di separare il rumore di fondo: il punto in cui la curva di amplificazione in fase esponenziale interseca il *threshold* rappresenta il **ciclo soglia** (Ct). L'utilizzo di coloranti aspecifici può portare alla formazione del segnale fluorescente anche come conseguenza dell'appaiamento tra primers o dell'amplificazione di prodotti aspecifici portando a una sovrastima della quantità del prodotto iniziale, risulta perciò necessario verificare tale specificità della reazione mediante la **curva di melting**. La curva di *melting*, ottenuta riscaldando progressivamente i campioni al termine dell'amplificazione, permette di evidenziare la presenza di eventuali dimeri di primers o prodotti aspecifici. La *real time* PCR può essere utilizzata indifferentemente sia per indagini qualitative (presenza/assenza) che quantitative:

- **Quantificazione assoluta.** La quantità di DNA iniziale è determinata mediante interpolazione del Ct del campione ignoto con la retta di taratura di uno standard esterno.
- **Quantificazione relativa.** La quantità iniziale di DNA è valutata in relazione ad un gene di riferimento interno, amplificato alle stesse condizioni.

Fig. 18 *Real time PCR*



#### 4.5 *Multiplex PCR*

La *Multiplex PCR* (Fig.19A) rappresenta un'evoluzione della PCR in cui più coppie di *primers* sono utilizzate per amplificare simultaneamente differenti sequenze nella stessa reazione di PCR. Questo metodo permette di analizzare contemporaneamente differenti regioni bersaglio comportando un importante risparmio sia economico sia in termini di tempo. D'altro canto, è necessario che tutte le coppie di *primers* funzionino alle medesime condizioni di amplificazione, esiste inoltre il rischio che si possa avere formazione di primer-dimer tra vari *primers* e conseguente diminuzione della sensibilità del test e/o un disequilibrio nell'amplificazione di alcuni bersagli rispetto ad altri. Questa metodica si dimostra particolarmente per il rilevamento simultaneo di più specie batteriche in un campione alimentare o di più geni caratterizzanti un determinato microrganismo come nel caso della ricerca dei geni di virulenza di *Listeria monocytogenes* o di *Escherichia coli* O157:H7 ( 78, 79, 80).

#### 4.6 Nested PCR

La *nested* PCR (Fig.19B) è una variante della tecnica di PCR che permette di ottenere una maggiore specificità della reazione. La metodica consiste essenzialmente in due amplificazioni distinte che prevedono l'utilizzo di due differenti coppie di *primers*: una coppia, da utilizzare nella prima PCR, che genera un amplificato di grandi dimensioni e una seconda coppia, da utilizzare nella successiva PCR, corrispondente a una regione di dimensioni più contenute presente all'interno del prodotto amplificato: se il prodotto della prima amplificazione fosse aspecifico la seconda PCR non andrebbe a buon fine .

Fig. 19A Multiplex PCR

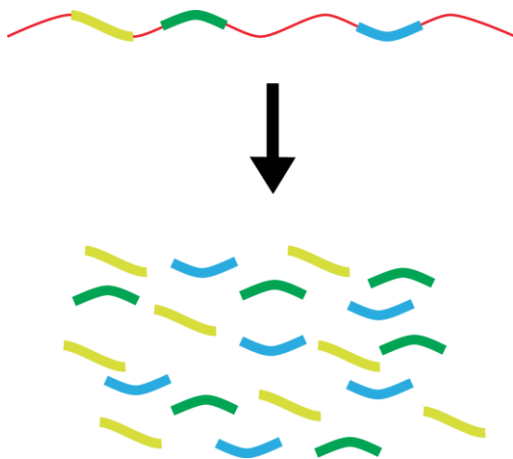
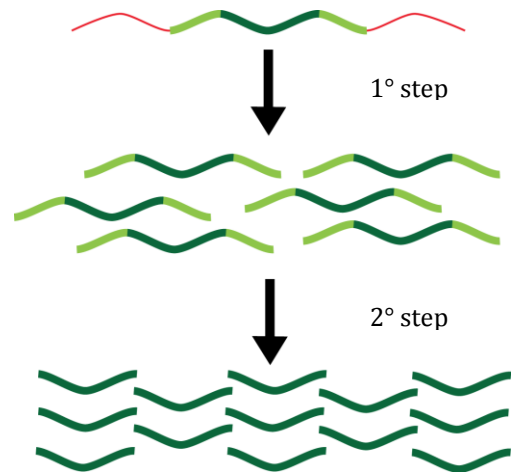


Fig.19B Nested PCR



#### 4.7 PMA Real time PCR

Rispetto alle tecniche di microbiologia classica, la PCR offre molti vantaggi per la rilevazione dei microrganismi patogeni negli alimenti: specificità, sensibilità, rapidità, accuratezza e la possibilità di rilevare cellule vitali ma non coltivabili (*viable but not culturable* –VBNC) (81). Tuttavia ci sono alcune problematiche legate all'utilizzo di questa tecnica, come il rischio di avere risultati falsi positivi e l'impossibilità di discriminare tra microrganismi vivi e morti (82, 83, 84, 85). Questo problema può essere risolto combinando la differenziazione tra cellule vitali e non, ottenuta attraverso l'utilizzo di coloranti intercalanti il DNA come il propidio monoazide (PMA) o l'etidio monoazide (EMA): PMA mostra, rispetto a EMA, una maggiore selettività nei confronti delle cellule morte.

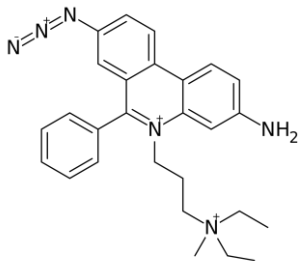
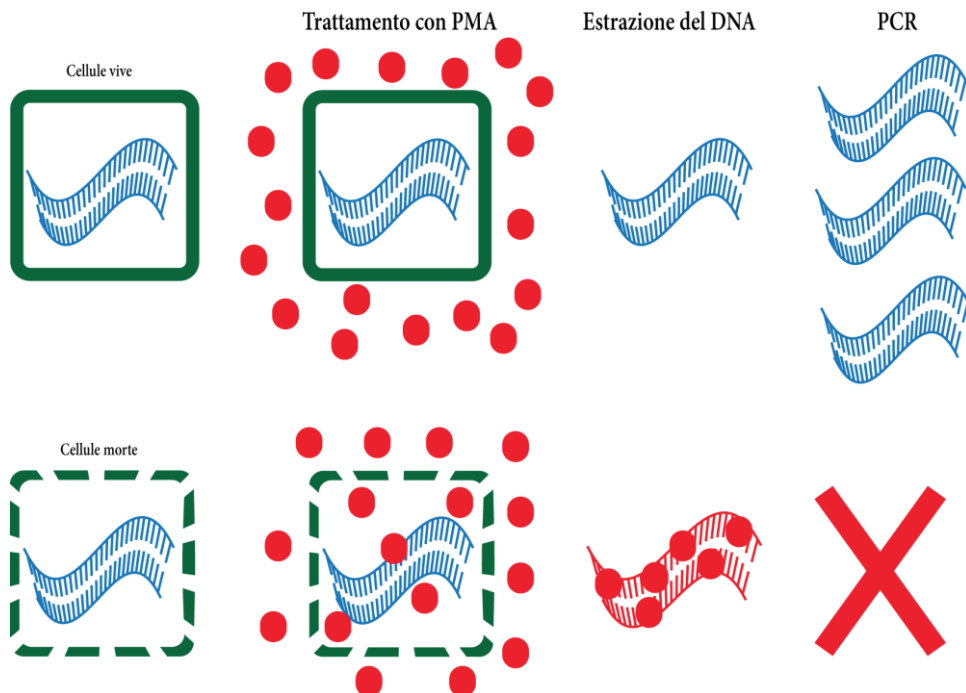


Fig. 20 PMA

Il PMA (Fig.20), caricato positivamente, non è in grado di passare attraverso le membrane biologiche intatte (delle cellule vitali). Il legame del PMA con il DNA delle cellule morte viene reso irreversibile dopo fotoattivazione con una lunghezza d'onda definita. Il DNA così modificato non può essere più disponibile per le successive reazioni di PCR (Fig.21). In questo modo è possibile riuscire a differenziare tra cellule vitali e non.

Fig. 21 Trattamento col PMA



## CAPITOLO 5

### 5.1 Scopo della tesi

Lo scopo della ricerca è stato:

- Valutazione della qualità microbiologica di prodotti ortofrutticoli di IV gamma di produzione nazionale.
- Valutazione dei fattori ecologici di crescita batterica, temperatura, pH e attività dell'acqua associati ai vegetali di IV gamma.
- Ricerca e quantificazione di *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 mediante *Real Time* PCR attraverso l'utilizzo di intercalanti.
- Caratterizzazione tossicologica dei ceppi di *Listeria monocytogenes* mediante PCR per valutare la presenza dei geni di virulenza utilizzando *primers* specifici.
- Caratterizzazione microbiologica di ambienti di produzione e della qualità dell'acqua utilizzata per l'irrigazione e la produzione dei prodotti ortofrutticoli di IV gamma.
- Valutazione dell'efficacia del processo di lavaggio nella riduzione della contaminazione microbiologica da *Enterobacteriaceae* nel processo di produzione di prodotti ortofrutticoli di IV gamma.
- Valutazione della *shelf life* dei prodotti ortofrutticoli di IV gamma.
- Allestimento di *Challenge test* di *Listeria monocytogenes* su prodotti vegetali di IV gamma, in condizioni di refrigerazione e di abuso termico per la valutazione del rischio.
- Sviluppo di *Challenge test* di *Listeria monocytogenes* attraverso l'utilizzo di geni *housekeeping* di *Listeria monocytogenes*.

## CAPITOLO 6

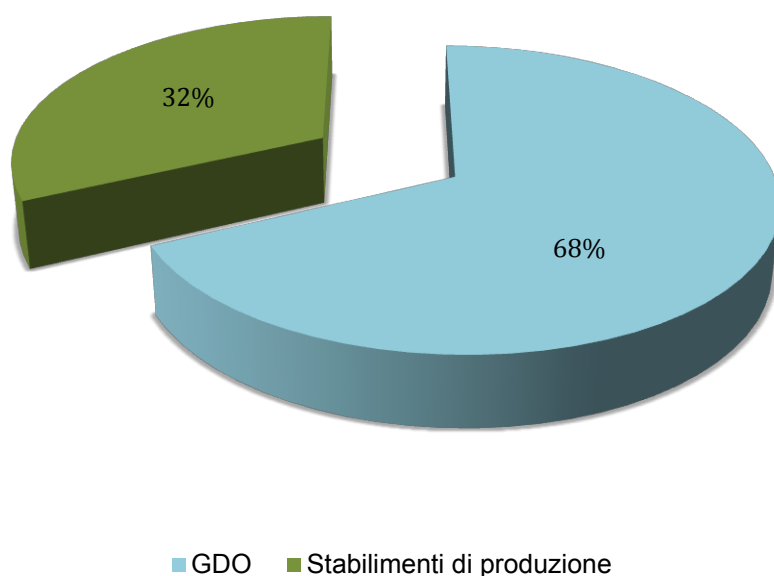
### 6.1 Materiali e metodi

Nel periodo compreso tra aprile 2012 e gennaio 2015, sono stati esaminati 300 campioni di vegetali di IV gamma provenienti da differenti lotti produttivi. Inoltre, presso alcuni stabilimenti di produzione, sono state eseguite indagini ambientali allo scopo di valutare l'igiene del processo.

### 6.2 Caratteristiche microbiologiche dei campioni di vegetali di IV gamma

I campioni, reperiti presso la grande distribuzione (68%) e stabilimenti di produzione (32%) (Fig.22), sono stati rappresentati da (Tab.6, Fig.23): “Carote alla julienne”, “Prezzemolo tritato”, “Insalate miste”, “Rucola”, “*Baby leaf*” e “Cuori di iceberg”. Per ciascun campione trattato sono stati misurati inoltre, temperatura, pH e attività dell'acqua ( $A_w$ ).

**Fig. 22 Provenienza dei campioni alimentari**

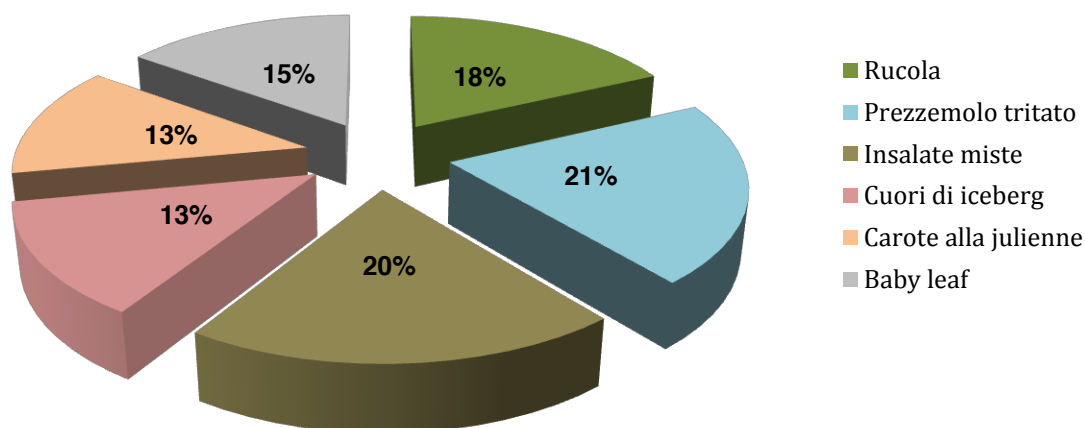


**Tab. 6 Campioni di prodotti vegetali di IV gamma analizzati.**

Tipologia campione	Numero campioni	Percentuale (%)
Prezzemolo tritato	62	21%
Insalate miste	59	20%
Rucola	54	18%
Insalate “ <i>Baby leaf</i> ”	45	15%
Carote alla julienne	40	13%
Cuori di iceberg	40	13%
<b>Totale</b>	<b>300</b>	<b>100%</b>



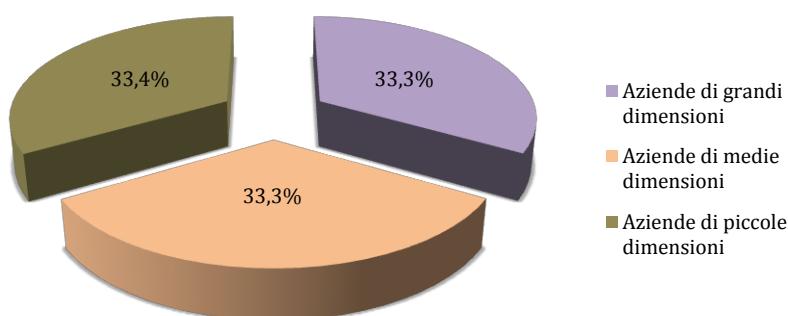
**Fig. 23 Prodotti vegetali di IV gamma**



### 6.3 Caratteristiche microbiologiche dei campioni ambientali

Nel periodo compreso tra aprile 2012 e gennaio 2015, sono stati sottoposti a indagine microbiologica 180 campioni ambientali provenienti da tre stabilimenti di produzione, rappresentativi di tre differenti realtà produttive: “grandi” (33.3%), “medie” (33.3%) e “piccole” (33.4%) dimensioni (Fig. 24).

**Fig. 24 Provenienza dei campioni ambientali**



I campionamenti (Tab. 7) hanno riguardato superfici destinate a entrare in contatto con gli alimenti e non destinate ad entrare in contatto, acque di processo e Aria.

**Tab. 7 Campioni ambientali analizzati.**

Tipologia campione	Numero campioni	Percentuale (%)	
Parete cella materia prima	9	70%	
Tagliere materia prima	12		
Coltello materia prima	9		
Tunnel	9		
Parete vasche lavaggio e risciacquo	9		
Nastro trasporto verdure lavate (1° fase)	9		
Nastro trasporto verdure rilavate (2° fase)	12		
Centrifuga (parete e cesta)	9		
Lavandino, Bacinelle prezzemolo	9		
Tritaverdure aglio/prezzemolo	12		
Taglierina funghi	9		
Piano di lavoro confezionati	9		
Nastro trasporto confezionati	9		
Acqua di lavaggio	9		15%
Acqua di risciacquo	9		
Acqua lavabo	9		
Aria a inizio lavorazione	9	15%	
Aria in fase di lavorazione	9		
Aria a fine lavorazione	9		
<b>Totale</b>	<b>180</b>		

#### 6.4 Indagini microbiologiche

Tutti i campioni, sia alimentari che ambientali, sono stati prelevati e trasportati a temperatura controllata in conformità con la Norma UNI EN ISO 7218:2013 relativa a “Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Requisiti generali e guida per le analisi microbiologiche”.

L’applicazione dei metodi di prova per la ricerca e quantificazione di microrganismi patogeni e indicatori di processo è stata condotta presso il Laboratorio di Igiene degli Alimenti, Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Clinica e Molecolare, dell’Università degli Studi di Cagliari, che opera in conformità alla norma UNI EN CEI ISO 17025:2005 sui “Requisiti generali per la competenza dei Laboratori di prova e taratura”.

Nei campioni alimentari è stata valutata la presenza di microrganismi indicatori di processo (Conta mesofila totale e psicrofila, *Enterobacteriaceae*, Muffe e Lieviti), parametri microbiologici riguardanti criteri di sicurezza indicati nei regolamenti Europei (67), (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*) ed altri microrganismi patogeni (*Yersinia enterocolitica* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Per i campioni di acqua si è proceduto alla ricerca e quantificazione di *Escherichia coli*, *Enterococchi*, *Pseudomonas* spp., Conta microbica a 22°C e a 36°C. Le indagini analitiche su superfici hanno riguardato la quantificazione dei livelli di contaminazione espressi dalla Conta mesofila totale, *Enterobacteriaceae* e *Escherichia coli*.

L'analisi microbiologica dell'aria ha riguardato la stima dei livelli di contaminazione attraverso la valutazione della Conta mesofila totale.

#### 6.4.1 Preparazione del campione

I campioni sono stati trattati secondo la norma ISO 6887-1/2000 (*preparazione del campione di prova, sospensione iniziale e diluizioni decimali per l'analisi microbiologica*).

I metodi analitici di riferimento sono riportati in Tab.12.

<b>Tab. 12 Metodi analitici di riferimento</b>	
<b>Metodica di riferimento</b>	<b>Parametro microbiologico</b>
<b>Prodotti alimentari</b>	
UNI EN ISO 4833-1:2013	Conta mesofila totale a 30°C
UNI EN ISO 17410:2001	Conta microrganismi psicrofili a 5°C
ISO 21528-2:2004	<i>Enterobacteriaceae</i>
UNI ISO 16649-2:2010	<i>Escherichia coli</i> β-glucuronidasi positivi
UNI EN ISO 11290-1:2005	<i>Listeria monocytogenes</i> analisi qualitativa
UNI EN ISO 11290-2:2005	<i>Listeria monocytogenes</i> analisi quantitativa
UNI EN ISO 6579:2008	<i>Salmonella</i> spp. qualitativa
UNI EN ISO 10273:2005	<i>Yersinia enterocolitica</i>
UNI EN ISO 13720:2010	<i>Pseudomonas</i> spp.
<b>Acque di processo</b>	
UNI EN ISO 6222:2001	Conta delle colonie a 36°C e 22°C
UNI EN ISO 7899-2:2003	<i>Enterococchi</i> intestinali
UNI EN ISO 9308-1:2002	<i>Escherichia coli</i>
UNI EN ISO 16266:2008	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>Superfici</b>	
ISO 18593:2004 + ISO 4833-1:2013	Conta mesofila totale a 30°C
ISO 18593:2004 + ISO 21528-2:2004	<i>Enterobacteriaceae</i>
ISO 18593:2004 + UNI ISO 16649-2:2010	<i>Escherichia coli</i> β-glucuronidasi positivi

#### 6.4.2 Limiti microbiologici

Per la valutazione del rischio associato al consumo di prodotti ortofruitticoli di IV gamma sono stati valutati, oltre ai criteri di sicurezza di processo (*E.coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp.), indicati nei regolamenti Europei attualmente in vigore (67), anche altri parametri microbiologici, con l'intenzione di ottenere degli indicatori generici di igiene.

I limiti di riferimento, ove non specificamente normati, rappresentano dei “valori guida” in riferimento alla qualità del prodotto (70) stabiliti in accordo con i dati presenti in letteratura scientifica (Tab. 8, Tab.9).

**Tab.8 Criteri microbiologici di riferimento per i prodotti pronti al consumo (67)**

Criteri di processo						
Categoria alimentare	Microrganismi	Piano di campionamento		Limiti		Azioni in caso di risultati insoddisfacenti
		n	c	m	M	
2.5.1 Frutta e ortaggi pretagliati (pronti al consumo)	<i>E.coli</i>	5	2	10 <sup>2</sup> ufc/g	10 <sup>3</sup> ufc/g	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione della scelta delle materie prime
Criteri di sicurezza						
1.2 Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L.monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	10 <sup>2</sup> ufc/g <sup>(5)</sup>		Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
		5	0	Assente in 25g <sup>(7)</sup>		Prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce
1.3 Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L.monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali <sup>(4,8)</sup>	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	10 <sup>2</sup> ufc/g		Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.19 Frutta e ortaggi (pronti al consumo)	<i>Salmonella spp</i>	5	0	Assente in 25g		Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

**Tab.9 Limiti microbiologici di riferimento per i prodotti vegetali di IV gamma**

Parametro	Limite di riferimento	Bibl
Conta mesofila totale a 30°C	5 x 10 <sup>7</sup> UFC/g	(86)
Conta microrganismi psicrofili a 5°C	5 x 10 <sup>7</sup> UFC/g*	
<i>Enterobacteriaceae</i>	10 <sup>4</sup> UFC/g*	
Muffe e lieviti	10 <sup>4</sup> UFC/g*	

\*limiti non presenti in normativa

Anche la valutazione della qualità microbiologica dei campioni ambientali è stata ricondotta all'utilizzo di limiti di riferimento estrapolati dalla letteratura scientifica (88) (Tab.10, Tab.11).

Tab.10 Valori guida per la valutazione di superfici destinate a venire a contatto con gli alimenti

Parametro	UFC/cm <sup>2</sup>	Significato	Giudizio	Bibl.
CMT	<25	Carica batterica accettabile	Sanificazione ottima	(70, 89)
	25-50	Carica batterica accettabile	Sanificazione buona	
	50-100	Valore superiore di accettabilità	Sanificazione accettabile	
	>100	Carica batterica non accettabile	Sanificazione non adeguata	
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1	Carica batterica accettabile	Sanificazione ottima	
	1-5	Carica batterica accettabile	Sanificazione buona	
	5-10	Valore superiore di accettabilità	Sanificazione accettabile	
	>10	Carica batterica non accettabile	Sanificazione non adeguata	
<i>E.coli</i>	< 1 UFC/cm <sup>2</sup> in superfici correttamente sanificate			
<i>S. aureus</i>	Assente in superfici correttamente sanificate			
<i>Salmonella</i> spp.	Assente in superfici correttamente sanificate			
<i>L. monocytogenes</i>	Assente in superfici correttamente sanificate			

Tab. 11 Valori guida per la qualità microbiologica dell'aria e dell'acqua

Aria				
Parametro	UFC/m <sup>3</sup>	Significato	Giudizio	Bibl.
CMT	<250	Carica batterica accettabile	Ottima	(70)
	250-500	Carica batterica accettabile	Buona	
	>500	Carica batterica non accettabile	Non adeguata	
Muffe e lieviti	<50	Carica batterica accettabile	Ottima	
	50-100	Carica batterica accettabile	Sufficiente	
	>100	Carica batterica non accettabile	Non adeguata	
Acqua				
Parametro	UFC/100ml			
<i>E. coli</i>	0			
<i>Enterococchi</i>	0			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0			

## Determinazione dei parametri ecologici

Su ogni campione la misurazione del pH e dell' $A_w$  è stata eseguita, mediante strumenti tarati attraverso l'utilizzo di soluzioni standard certificate (Tab.13).

**Tab. 13 Parametri ecologici determinati e relative metodiche**

Misura	Stumento
pH	pHmetro (pH 510 Eutech Istruments)
$A_w$	Igrometro (AcquaLab- Dew Point- Water activity meter – 4TE)

### 6.5 Analisi biomolecolari

Le indagini biomolecolari, eseguite sulla base delle norme Internazionali di riferimento (Tab.14), hanno previsto la valutazione della presenza nei prodotti vegetali di IV gamma di *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 e *Salmonella* spp. Inoltre si è provveduto alla ricerca dei principali determinanti di virulenza di *Listeria monocytogenes* e di *Escherichia coli* O157:H7 (90, 91). Le indagini biomolecolari sono state eseguite presso il Laboratorio di Igiene degli Alimenti dell'Università degli Studi di Cagliari (Tab.14).

Tab. 14 Norme di riferimento per le indagini di Biologia Molecolare

Norma	Denominazione
UNI EN ISO 22174:2005	Microbiologia degli alimenti e mangimi per animali. Reazione a catena della polimerasi (PCR) per la ricerca di microrganismi patogeni degli alimenti. Requisiti generali e definizioni.
UNI EN ISO 20837:2005	Microbiologia degli alimenti e mangimi per animali. Reazione a catena della polimerasi (PCR) per la ricerca di microrganismi patogeni degli alimenti. Requisiti per la preparazione del campione per la ricerca qualitativa.
UNI EN ISO/TS 20836:2005	Microbiologia degli alimenti e mangimi per animali. Reazione a catena della polimerasi (PCR) per la ricerca di microrganismi patogeni degli alimenti. Prove di prestazione per apparecchiature di ciclizzazione termica.
UNI EN ISO 20838:2006	Microbiologia degli alimenti e mangimi per animali. Reazione a catena della polimerasi (PCR) per la ricerca di microrganismi patogeni degli alimenti. Requisiti per l'amplificazione e la ricerca per metodi qualitativi.

#### 6.5.1 Estrazione del DNA batterico da matrici alimentari

L'estrazione del DNA batterico dai prodotti vegetali di IV gamma è stata eseguita attraverso l'utilizzo del "*Bacterial Genomic DNA Isolation Kit*" (Diatheva). La metodica prevede l'estrazione del DNA batterico da un'aliquota (1ml) del brodo di prearricchimento "*Multipathogen enrichment medium*" (Diatheva) dopo incubazione per  $18 \pm 2$ h a  $37 \pm 2$ °C. Allo scopo di migliorare la resa dell'estrazione, il procedimento viene effettuato in parallelo su 4 aliquote provenienti dallo stesso campione. Il kit di estrazione prevede la separazione e

purificazione del DNA attraverso l'utilizzo di colonnine da microcentrifuga. Il DNA così ottenuto è stato utilizzato per le successive indagini di PCR e stoccato a -20°C.

### 6.5.2 Real time PCR

La ricerca di *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ed *Escherichia coli* O157 è stata eseguita attraverso l'utilizzo del "Multipathogen fluo kit" (Diatheva). La presenza di eventuali sostanze capaci di inibire la reazione è stata valutata attraverso l'utilizzo di un controllo interno di amplificazione allo scopo di evitare risultati falsi negativi. Il kit contiene inoltre un controllo positivo per valutare l'effettivo andamento della reazione.

La reazione di PCR (Tab.15) è stata eseguita mediante l'utilizzo del termociclatore *Stratagene* MX 3000P.

Step	Temperatura	Tempo	Cicli
Denaturazione iniziale	95°C	10 minuti	1
Denaturazione	95°C	20 secondi	45
Appaiamento/Estensione	63°C	1 minuto	

### 6.5.3 Estrazione del DNA batterico da coltura pura

I ceppi batterici identificati a livello biochimico come *Listeria monocytogenes* e *E.coli* sono stati sottoposti a caratterizzazione molecolare mediante PCR per l'identificazione dei principali geni responsabili della virulenza.

Le colture batteriche pure, derivanti da incubazione *overnight* a 37°C in Nutrient Agar (Microbiol), sono state utilizzate per la preparazione della sospensione batterica in 1ml in acqua sterile per PCR (Roth). La coltura è stata centrifugata a 15000xg (~ 13000 rpm) per 5 minuti; è stato eliminato il surnatante ed è stato risospeso il *pellet* batterico in 1 ml di acqua sterile per PCR. Le provette contenenti la sospensione, sono state poste in termoblocco a 100 °C per 10 minuti e successivamente utilizzate per le reazioni di PCR.

### 6.5.4 Ricerca dei geni di virulenza di *Listeria monocytogenes*

I primers (Tab. 16) utilizzati per la ricerca dei geni di virulenza di *L. monocytogenes* (*prfA*, *rrn*, *hlyA*, *inlA*, *inlB*, *iap*, *plcA* e *plcB*) sono stati forniti dalla ditta Sigma-Aldrich; come miscela di reazione è stata utilizzata "illustra RTG PCR Beads" (GE Healthcare). Come ceppo di riferimento (controllo positivo) è stata utilizzato *Listeria monocytogenes* ATCC 35152, come controllo negativo acqua sterile per PCR.

<b>Tab. 16 Primers per la ricerca dei geni di virulenza di <i>Listeria monocytogenes</i></b>				
<b>Target</b>	<b>Nome</b>	<b>Sequenza del primer 5'-3'</b>	<b>Dimensioni (bp)</b>	<b>Bibl.</b>
<b>Prf A</b>	prf-A	CTG TTG GAG CTC TTC TTG GTG AAG CAA TCG	1060	(92)
	prf-B	AGC AAC CTC GGT ACC ATA TAC TAA CTC		
	lip1	GAT ACA GAA ACA TCG GTT GGC	274	(93)
	lip2	GTG TAA CTT GAT GCC ATC AGG		
<b>rrn</b>	rrn-F	CAG CAG CCG CGG TAA TAC	938	(94)
	rrn-R	CTC CAT AAA GGT GAC CCT		
<b>hlyA</b>	hlyA-F	CCT AAG ACG CCA ATC GAA	702	
	hlyA-R	AAG CGC TTG CAA CTG CTC		
<b>actA</b>	actA-F	GAC GAA AAT CCC GAA GTG AA	268 o 385	
	actA-R	CTA GCG AAG GTG CTG TTT CC		
<b>inlA</b>	inlA-F	CCT AGC AGG TCT AAC CGC AC	255	
	inlA-R	TCG CTA ATT TGG TTA TGC CC		
<b>inlB</b>	inlB-F	AAA GCA CGA TTT CAT GGG AG	146	
	inlB-R	ACA TAG CCT TGT TTG GTC GG		
<b>plcA</b>	plcA-R	CGA GCA AAA CAG CAA CGA TA	192	
	plcA-F	CCG CGG ACA TCT TTT AAT GT		
<b>plcB</b>	plcB-R	GGG AAA TTT GAC ACA GCG TT	261	
	plcB-F	ATT TTC GGG TAG TCC GCT TT		
<b>iap</b>	iap-F	ACA AGC TGC ACC TGT TGC AG	131	(80)
	iap-R	TGA CAG CGT GTG TAG TAG CA		

La rilevazione del gene *prfA* è stata effettuata attraverso una nested PCR *end point*: nel primo *step* 4µl di DNA estratto sono stati aggiunti alla mix di reazione (Tab.17) insieme a 0.5 µl di ciascun primers (*prfA*, *prfB*). La mix di reazione è stata sottoposta ad un iniziale denaturazione a 95°C per 1 min, seguita da 30 cicli composti da denaturazione 15 sec a 95°C, appaiamento 30 sec a 60°C, estensione 1:30 min a 72°C.

Nel secondo *step* 2 µl di DNA amplificato sono stati aggiunti alla mix di reazione (Tab.18) insieme a 0.5 µl di ciascun primers (*lip1* e *lip2*). La mix di reazione è stata sottoposta ad un iniziale denaturazione a 95°C per 5 min, 40 cicli composti da denaturazione 30 sec a 94°C, appaiamento per 30 sec a 55°C, estensione per 1 min a 74°C, seguiti da una estensione finale per 5 min a 74°C.

<b>Tab. 17 Nested PCR: miscela di reazione.</b>				
<b>Prima amplificazione</b>			<b>Seconda amplificazione</b>	
		<b>Volume</b>		<b>Volume</b>
<i>prf-A</i>	(20µM)	0.5µl	<i>Lip 1</i>	0.5µl
			(20µM)	
<i>prf-B</i>	(20µM)	0.5µl	<i>Lip 2</i>	0.5µl
			(20µM)	
<b>H2O PCR</b>		20µl	<b>H2O PCR</b>	23µl
<b>DNA template</b>		4µl	<b>DNA template</b>	2µl
<b>Volume totale</b>		<b>25µl</b>	<b>Volume totale</b>	<b>25µl</b>



<b>Tab. 18 Nested PCR: profilo termico</b>			
<b>Step 1</b>	Temperatura	Minuti	Cicli
<b>Denaturazione iniziale</b>	95°C	5:00	1
<b>Denaturazione</b>	95°C	0:15	30
<b>Appaiamento</b>	60°C	0:30	30
<b>Estensione</b>	72°C	1:30	30
<b>Step 2</b>	Temperatura	Minuti	Cicli
<b>Denaturazione iniziale</b>	95°C	5:00	1
<b>Denaturazione</b>	94°C	0:30	40
<b>Appaiamento</b>	55°C	0:30	40
<b>Estensione</b>	74°C	1:00	40
<b>Estensione finale</b>	74°C	5:00	40

Gli altri geni di virulenza (*rrn*, *hlyA*, *inlA*, *inlB*, *iap*, *plcA* e *plcB*) sono stati rilevati attraverso tre diverse multiplex PCR *end point* (Tab.19): una per i geni *rrn*, *hlyA* e *actA* (Multiplex 1), una per i geni *inlA*, *inlB* e *iap* (Multiplex 2) e l'ultima per i geni *plcA* e *plcB* (Multiplex 3). In tutti i casi alla mix di reazione (GE Healthcare) sono stati aggiunti 2µl di DNA estratto e 0.5µl di ciascun primer.

Tab.19 Multiplex PCR: miscele di reazione

<b>MULTIPLEX 1</b>		<b>MULTIPLEX 2</b>		<b>MULTIPLEX 3</b>	
<b>rrn - F</b>	0.5µl	<b>inlA- F</b>	0.5µl	<b>plcA- F</b>	0.5µl
<b>rrn - R</b>	0.5µl	<b>inlA - R</b>	0.5µl	<b>plcA - R</b>	0.5µl
<b>hlyA-F</b>	0.5µl	<b>inlB-F</b>	0.5µl	<b>plcB-F</b>	0.5µl
<b>hlyA-R</b>	0.5µl	<b>inlB-R</b>	0.5µl	<b>plcB-R</b>	0.5µl
<b>actA-F</b>	0.5µl	<b>iap-F</b>	0.5µl	<b>H2O PCR</b>	20 µl
<b>actA-R</b>	0.5µl	<b>iap-R</b>	0.5µl	<b>DNA template</b>	2 µl
<b>H2O PCR</b>	20 µl	<b>H2O PCR</b>	20 µl	<b>Volume totale</b>	25 µl
<b>DNA template</b>	2 µl	<b>DNA template</b>	2 µl		
<b>Volume totale</b>	25 µl	<b>Volume totale</b>	25 µl		

I cicli termici utilizzati per le reazioni di PCR sono indicati in Tab.20.

Tab. 20 Multiplex PCR: profili termici

<b>Multiplex 1</b>			
Step	Temperatura	Minuti	Cicli
<b>Denaturazione iniziale</b>	95°C	5:00	1
<b>Denaturazione</b>	94°C	1:20	24
<b>Appaiamento</b>	55°C	1:30	
<b>Estensione</b>	72°C	2:00	
<b>Estensione finale</b>	72°C	10:00	
<b>Multiplex 2, Multiplex 3</b>			
Step	Temperatura	Minuti	Cicli
<b>Denaturazione iniziale</b>	95°C	5:00	1
<b>Denaturazione</b>	94°C	1:00	35
<b>Appaiamento</b>	55°C	2:00	
<b>Estensione</b>	72°C	1:00	
<b>Estensione finale</b>	72°C	5:00	

I prodotti di PCR sono stati visualizzati in gel di agarosio al 2%, previa colorazione con Bromuro di etidio.

### 6.5.5 Ricerca dei geni di virulenza di *Escherichia coli* O157:H7

I primers (Tab. 21) utilizzati per la ricerca dei geni di virulenza di *E. coli* O157:H7 (*uidA*, *eae*, *E-hly*, *sxt1* e *sxt2*) sono stati forniti dalla ditta Sigma-Aldrich; come miscela di reazione è stata utilizzata “illustra RTG PCR Beads” (GE Healthcare). Come ceppo di riferimento (controllo positivo) è stato utilizzato *E. coli* O:157 H7 NCTC 12900, come controllo negativo, acqua sterile per PCR.

<b>Tab. 21 Primers per la ricerca dei geni di virulenza di <i>E. coli</i> O157:H7</b>				
Target	Nome	Sequenza del primer 5'-3'	Dimensioni (bp)	Bibl.
<b>uid A</b>	<i>uid A-F</i>	GCG AAA ACT GTG GAA CTG GG	252	
	<i>uid A-R</i>	TGA TGC TCC ATA ACT TCC TG		
<b>eae</b>	<i>eae-F</i>	TCA ATG CAG TTC CGT TAT CAG TT	482	
	<i>eae-R</i>	GTA AAG TCC GTT ACC CCA ACC TG		
<b>E-hly</b>	<i>E-hly-F</i>	ACG ATG TGG TTT ATT CTG GA	166	(79)
	<i>E-hly-R</i>	CTT CAC GTC ACC ATA CAT AT		
<b>sxt 1</b>	<i>sxt 1-F</i>	CAG TTA ATG TGG TGG CGA AGG	348	
	<i>sxt 1-R</i>	CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG		
<b>sxt 2</b>	<i>sxt 2-F</i>	ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G	584	
	<i>sxt 2-R</i>	GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C		

Alla mix di reazione (GE Healthcare) sono stati aggiunti 2 µl di DNA estratto e 0.5 µl di ciascun primers (Tab. 22), mentre i cicli termici utilizzati per le reazioni di PCR sono indicati in Tab. 23.

**Tab. 22 Multiplex PCR: miscele di reazione**

MULTIPLEX PCR	
<i>uid A-F</i>	0.5 $\mu$ l
<i>uid A-R</i>	0.5 $\mu$ l
<i>eae-F</i>	0.5 $\mu$ l
<i>eae-R</i>	0.5 $\mu$ l
<i>E-hly-F</i>	0.5 $\mu$ l
<i>E-hly-R</i>	0.5 $\mu$ l
<i>sxt 1-F</i>	0.5 $\mu$ l
<i>sxt 1-R</i>	0.5 $\mu$ l
<i>sxt 2-F</i>	0.5 $\mu$ l
<i>sxt 2-R</i>	0.5 $\mu$ l
<b>H2O PCR</b>	17 $\mu$ l
<b>DNA template</b>	3 $\mu$ l
<b>Volume totale</b>	25 $\mu$ l

**Tab. 23 Multiplex PCR: profili termici**

Step	Temperatura	Minuti	Cicli
<b>Denaturazione iniziale</b>	95°C	5:00	1
<b>Denaturazione</b>	94°C	1:30	35
<b>Appaiamento</b>	55°C	1:30	35
<b>Estensione</b>	72°C	1:30	35

## 6.6 Shelf life

Trentasei campioni di insalate miste di IV gamma appartenenti a differenti lotti di produzione e provenienti da tre produttori diversi, prelevati negli stabilimenti di produzione, sono stati trasportati a temperatura controllata nel Laboratorio di Igiene degli Alimenti e conservati ad una temperatura di  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ , costantemente monitorata attraverso l'utilizzo di data logger. Lo studio di *shelf-life* è stato condotto attraverso la valutazione della conta mesofila e psicofila totale, di *Enterobacteriaceae* e di *Pseudomonas* spp. (Tab.24).

**Tab. 24 Metodi analitici di riferimento**

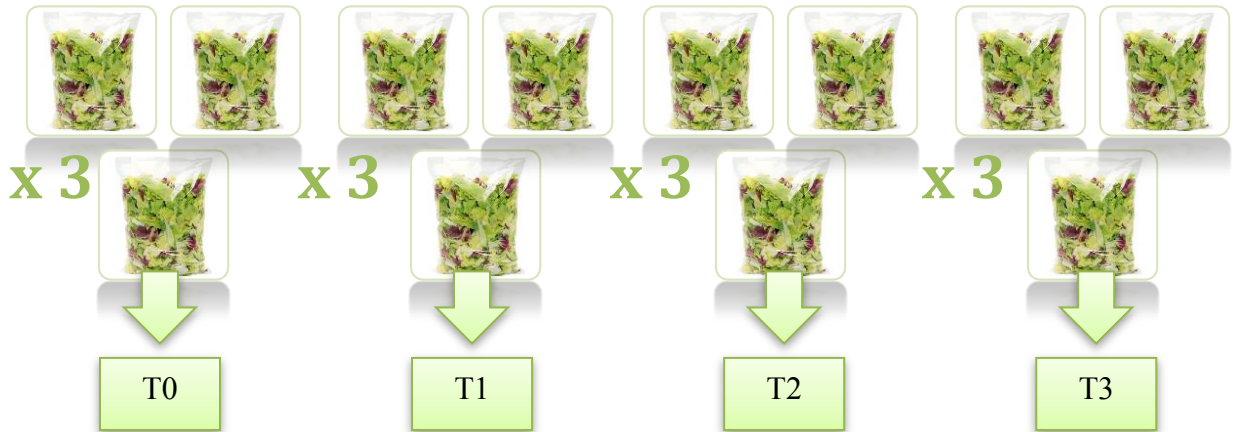
Metodica di riferimento	Parametro microbiologico
UNI EN ISO 4833-1:2013	Conta mesofila totale a 30°C
UNI EN ISO 17410:2001	Conta microrganismi psicrofili a 5°C
ISO 21528-2:2004	<i>Enterobacteriaceae</i>
UNI EN ISO 13720:2010	<i>Pseudomonas</i> spp.

Le indagini analitiche per la quantificazione dei suddetti parametri sono state condotte in corrispondenza di quattro tempi (T0,T1,T2,T3):

- T0 momento della produzione
- T1 metà *shelf life*
- T2 fine *shelf life*
- T3 fine della *shelf life* + 25% della *shelf life*

Su ciascun campione sono state effettuate tre repliche (Fig. 25).

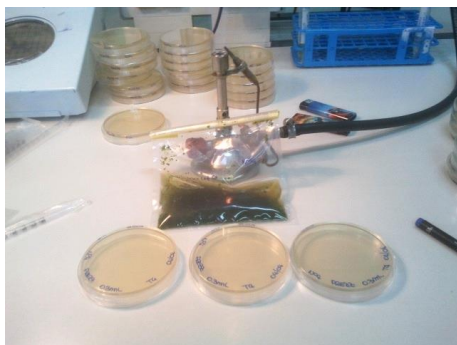
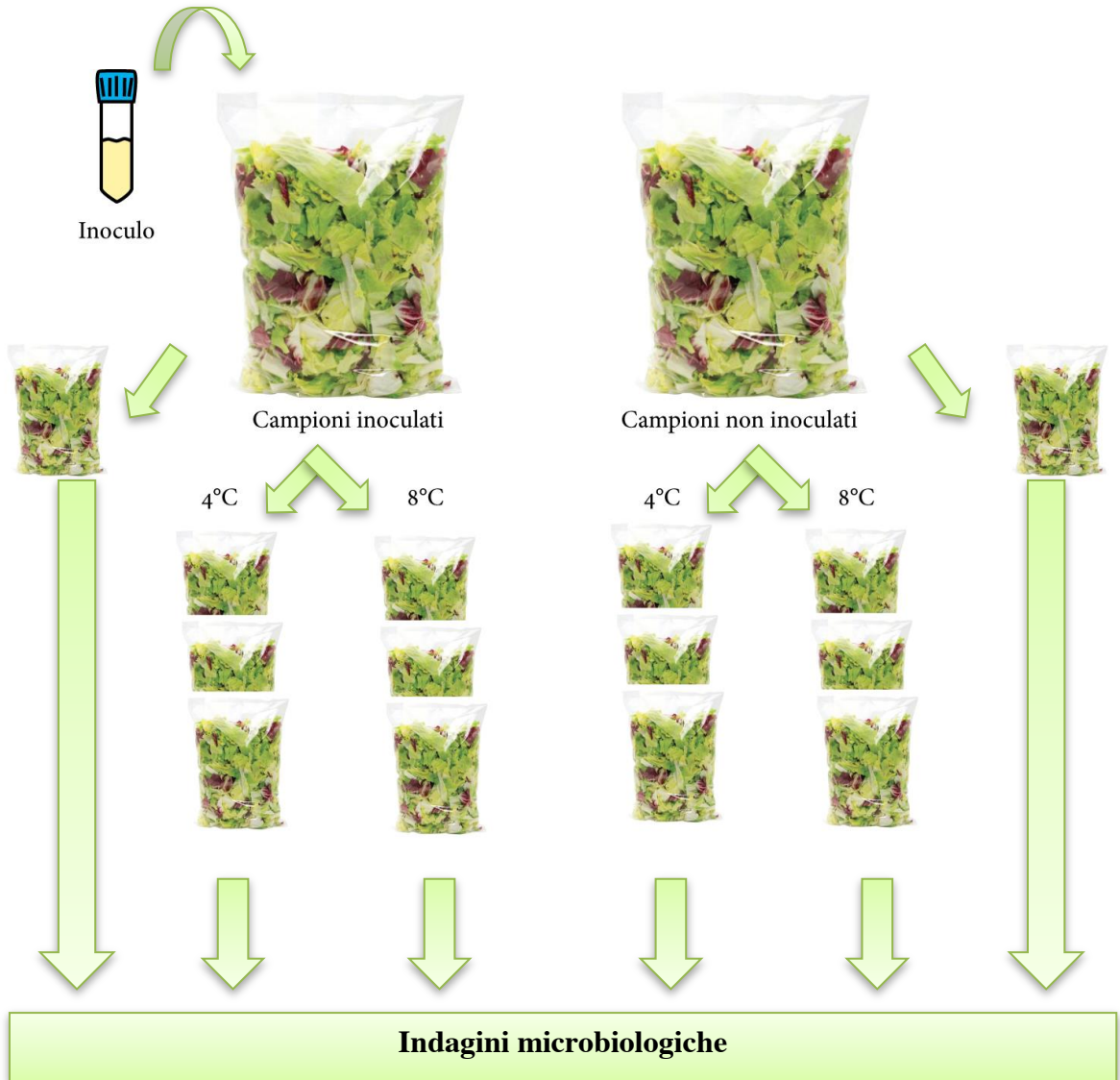
Fig. 25 Shelf life dei prodotti vegetali di IV gamma



## 6.7 Challenge Test microbiologici

Per valutare la dinamica di crescita di *L. monocytogenes* nei vegetali di IV gamma sono stati allestiti challenge tests su 24 lotti di prodotti ( Fig.26). (95, 96, 97 B, B B).

Fig. 26 Challenge test dei prodotti vegetali di IV gamma



I *challenge test* sono stati condotti sulle seguenti tipologie di prodotto di IV gamma: “Carote alla julienne” (3 lotti di produzione), “Prezzemolo tritato” (6 lotti di produzione), “Prezzemolo intero” (3 lotti di produzione), “Insalate miste” (3 lotti di produzione) e “Rucola tritata” (6 lotti di produzione), “Rucola intera” (3 lotti di produzione).

### **6.7.1 Verifica dell’assenza del microrganismo Target nell’alimento**

Prima di procedere alla contaminazione sperimentale è stata verificata l’assenza del microrganismo target sui campioni, sia mediante tecniche colturali che molecolari.

### **6.7.2 Preparazione della sospensione microbica**

Ciascun ceppo di *Listeria monocytogenes*, conservato in Brodo glicerolo (Microbiol) ad una temperatura di  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , è stato scongelato e trapiantato in Nutrient Agar (Microbiol) e incubato alla temperatura di  $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , per un tempo sufficiente al raggiungimento dell’inizio della fase stazionaria. In seguito, è stato eseguito un secondo trapianto allo scopo di far crescere il microrganismo alla temperatura ( $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) più vicina alle condizioni di stoccaggio del prodotto, fino all’inizio della fase stazionaria. Le colonie così ottenute sono state utilizzate per l’allestimento, mediante l’utilizzo di un Nefelometro (*Densimat bioMérieux*) di due sospensioni batteriche a titolo noto con concentrazioni pari a 1 McFarland.

Le sospensioni relative a ciascun ceppo sono state miscelate in parti uguali per ottenere la sospensione di lavoro utilizzata per l’allestimento delle successive diluizioni, in soluzione fisiologica. Tale procedura ha avuto come scopo quello di ottenere una concentrazione, nel prodotto alimentare, simile a quanto potrebbe realisticamente verificarsi in condizioni naturali (10-100 UFC/g). La concentrazione batterica dell’inoculo è stata confermata attraverso la semina per inclusione in Tryptone Soy Agar (Microbiol).

### **6.7.3 Modalità di inoculo**

Per ogni lotto esaminato, sono stati selezionati 60 campioni del peso di 10 g ciascuno. I campioni sono stati così suddivisi:

- 15 campioni contaminati e conservati a una temperatura di  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$
- 15 campioni contaminati e conservati a una temperatura di  $8\pm 2^{\circ}\text{C}$
- 15 campioni non contaminati e conservati a una temperatura di  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$
- 15 campioni non contaminati e conservati a una temperatura di  $8\pm 2^{\circ}\text{C}$

I campioni sono stati conservati alle temperature di  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $8 \pm 2^{\circ}\text{C}$  in modo da simulare condizioni di conservabilità ottimali e di abuso termico riferite in particolar modo all'ambiente domestico e alla movimentazione dei prodotti in fase di commercializzazione. In entrambi i casi, la temperatura di conservazione è stata costantemente monitorata mediante l'utilizzo di termometri tarati.

#### **6.7.4 Indagini microbiologiche**

Su ciascun campione per la conta di *Listeria monocytogenes*, durante la *shelf life*, sono state eseguite tre repliche (UNI EN ISO 11290-2:2005), in corrispondenza dei tempi prestabiliti:

- T0, 24 h dopo l'inoculo;
- T1, dopo 3 giorni;
- T2 dopo 5 giorni (corrispondente al superamento del periodo di latenza del microrganismo a  $4^{\circ}\text{C}$ );
- T3, dopo 7 giorni (corrispondente alla fine della *shelf life*);
- T4, dopo 9 giorni (corrispondente alla fine della *shelf life* + 25% della *shelf life* stessa);

In corrispondenza di ogni tempo si è provveduto alla valutazione dei valori di pH e  $A_w$ .

#### **6.7.5 Calcolo del potenziale di crescita**

Per potenziale di crescita ( $\delta$ ) s'intende la differenza tra il Log10 UFC/g del livello di concentrazione di *L. monocytogenes* alla fine del *Challenge test* (T4) ed il Log10 UFC/g della concentrazione iniziale (T0).

Nel contesto dell'applicazione del Regolamento (CE) n. 1441/2007,  $\delta$  può essere utilizzato per classificare un prodotto alimentare:

- quando  $\delta > 0.5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ , il prodotto è classificato come "Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*, diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali " (categoria 1.2);
- quando  $\delta \leq 0.5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ , il prodotto è classificato come "Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*, diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali " (categoria 1.3).

## 6.8 Determinazione della MIC e della MBC di Sostanze con potenziale attività antimicrobica.

Le determinazioni dei valori di MIC (Concentrazione minima inibente) e MBC (Concentrazione minima battericida) di Cumarina e Apiolo nei confronti di *L.monocytogenes* sono state rilevate attraverso il metodo della microdiluizione seriale in brodo su micropiastre da 96 pozzetti.

Gli estratti resi disponibili dal Laboratorio di Chimica degli Alimenti del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università di Cagliari, sono stati testati a partire da una concentrazione pari a 1800 µg/ml. In ciascun pozzetto sono state ottenute le diluizioni seriali del composto da testare.

Da una coltura pura di *Listeria monocytogenes* ATCC 35152 alle 24 h, si è proceduto alla preparazione di 100 µL di inoculo con concentrazione pari a circa  $5 \times 10^5$  UFC/ml che è stata dispensata in ciascun pozzetto. Dopo incubazione a  $37^\circ\text{C} \pm 1$  per 24 ore e a  $4^\circ\text{C}$  per 10 giorni è stata valutata la crescita batterica attraverso la formazione di un pellet.

## 6.9 Challenge test biomolecolari

La valutazione della crescita e vitalità di *L. monocytogenes* in campioni di prezzemolo tritato, inoculati sperimentalmente, è stata compiuta attraverso la ricerca e quantificazione (*Real Time* PCR) del gene *housekeepingftsZ*, codificante per la proteina strutturale FtsZ, implicata nella formazione del setto di separazione cellulare. La coppia di *primers* (Tab.25) è stata disegnata sulla base delle sequenze geniche relative ai target (*L. monocytogenes* Lm60) depositate in *GenBank* (Genetic Sequence Data Bank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), database gestito dal National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Target	Nome	Sequenza del primer 5'-3'	Dimensioni (bp)
<i>ftsZ</i>	PLm_ftsZ-370F	ATGGGCGCTTAAGTAGGT	251
	PLm_ftsZ-620R	ATTAAACCAGGAACGGCAATC	

### 6.9.1 Trattamento con il PMA

Il brodo di prearricchimento utilizzato per le indagini microbiologiche è stato utilizzato per la ricerca biomolecolare delle cellule vitali di *L. monocytogenes*.



Il trattamento con PMA (BLU Viability PMA kit - Qiagen), eseguito come da indicazione del produttore, ha permesso di ottenere un campione in cui il DNA delle cellule morte non è più disponibile per le successive reazioni di PCR.

### 6.9.2 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA dai campioni trattati con PMA è stata eseguita attraverso l'utilizzo del "Bacterial Genomic DNA Isolation Kit" (Diateva). Il DNA ottenuto è stato utilizzato per le successive indagini di PCR e stoccato a -20°C.

### 6.10 Real time PCR

La rilevazione e quantificazione assoluta del gene *ftsZ* è stata effettuata attraverso *real time* PCR (Stratagene MX 3000P): la mix di reazione (Takara) (Tab. 26, Tab. 27) è stata sottoposta ad un iniziale denaturazione a 95°C per 5min, seguita da 40 cicli composti da denaturazione per 30 sec a 95°C, appaiamento per 60 sec a 55°C, estensione per 60 sec a 72°C. Come ceppo di riferimento (controllo positivo) è stata utilizzata *Listeria monocytogenes* ATCC 35152 mentre come controllo negativo, acqua sterile per PCR; la specificità della reazione è stata valutata a ogni seduta analitica mediante la relativa curva di *melting*.

**Tab. 26 PMA Real time PCR: miscela di reazione**

	Volume	Concentrazione finale
<b>SYBR (2X)</b>	12.5 $\mu$ l	1X
<b>Ftsz_F (20uM)</b>	0.25 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
<b>Ftsz_R (20uM)</b>	0.25 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
<b>ROX Dye (50X)</b>	0.5 $\mu$ l	1X
<b>H<sub>2</sub>O</b>	6 $\mu$ l	
<b>DNA</b>	5 $\mu$ l	
<b>Volume totale</b>		

**Tab. 27 PMA Real time PCR: profilo termico**

Step	Temperatura	Minuti	Cicli
<b>Denaturazione iniziale</b>	95°C	5:00	1
<b>Denaturazione</b>	94°C	0:30	
<b>Appaiamento</b>	55°C	1:00	40
<b>Estensione</b>	72°C	1:00	
<b>Curva di melting</b>	95°C	15 sec	
	60°C	60 sec	1
	95°C	15 sec	

## 6.11 Curve di crescita

E' stato valutato il comportamento di *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* nel prodotto di IV gamma in assenza di fenomeni di competizione con altre specie microbiche.

Le curve di crescita sono state ottenute utilizzando due terreni di coltura differenti: Nutrient broth (Microbiol) come terreno di controllo e, come terreno test, un terreno non arricchito a base di prezzemolo prodotto sperimentalmente (*Parsley Broth*).

### 6.11 .1 Preparazione del *Parsley Broth*

Il *Parsley Broth* rappresenta un terreno di coltura minimo caratterizzato da una formulazione il più possibile simile alla materia prima.

Il prezzemolo utilizzato per la preparazione del brodo è stato pesato e centrifugato con l'ausilio di una centrifuga.

Il succo raccolto in microprovette è stato centrifugato per 10 minuti a 12.9xg, allo scopo di eliminare la parte corpuscolata e raccogliere il surnatante.

Il concentrato così ottenuto è stato sterilizzato mediante l'ausilio di un filtro sterile da siringa, con pori da 0.20 µm (Millipore) e ricostituito in Soluzione fisiologica sterile (Fig.27).

Fig. 27 Fasi della preparazione del *Parsley broth*



### 6.11.2 Preparazione dell'inoculo

Due differenti brodocolture sono state preparate utilizzando una miscela di ceppi ATCC (*L. monocytogenes* ATCC 35152 e *P. aeruginosa* ATCC 9027) e ceppi isolati in matrici alimentari simili.

La preparazione dell'inoculo, sovrapponibile alla metodica utilizzata per il *Challenge test*, ha permesso di ottenere brodocolture di partenza caratterizzate da una concentrazione pari a 50 UFC/ml.

Per ciascuna curva di crescita sono state effettuate dieci repliche. Le brodocolture sono state incubate sia alla temperatura di 4°C che di 37°C. In entrambe i casi, la temperatura di conservazione è stata costantemente monitorata mediante l'utilizzo di termometri tarati.

### 6.11.3 Indagini microbiologiche

Ogni brodocoltura è stata monitorata nel corso di 15 ore attraverso indagini analitiche effettuate ogni tre ore. Si è provveduto alla semina in specifici terreni colturali solidi (Tab.28) di un'aliquota (100 µl) delle brodocolture, per un totale di 6 determinazioni:

- T0 Conferma dell'inoculo
- T1 dopo 3 ore
- T2 dopo 6 ore
- T3 dopo 9 ore
- T4 dopo 12 ore
- T5 1 dopo 5 ore

Solo nel caso di *L. monocytogenes* incubata a 4°C sono state effettuate semine successive alla quindicesima ora, ogni 24 ore per sette giorni.

**Tab. 28 Terreni di coltura selettivi**

Microrganismo	Terreno di coltura
<i>Listeria monocytogenes</i>	ALOA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cetrimide agar

## 6.12 Processo di lavaggio dei prodotti vegetali di IV gamma

L'efficacia del processo di lavaggio dei prodotti vegetali di IV gamma è stata valutata attraverso l'allestimento di prove sperimentali atte a simulare il reale trattamento subito dai vegetali durante la fase di produzione, con particolare attenzione alla qualità e alla temperatura dell'acqua utilizzata. Preliminarmente è stata valutata la qualità dell'acqua di rete, utilizzata per l'esperimento, attraverso la rilevazione delle Conte a 36°C e a 22°C, *E. coli*, *Enterococchi*, Coliformi totali e *P. aeruginosa*. Il processo di lavaggio è stato eseguito attraverso 5 risciacqui consecutivi (Fig.28), della durata di un minuto ciascuno, eseguiti in parallelo simulando quattro differenti situazioni:

- Acqua di rete refrigerata;
- Acqua di rete refrigerata e ghiaccio;
- Acqua imbottigliata refrigerata;
- Acqua imbottigliata refrigerata e ghiaccio.

Fig. 28 Processo di lavaggio dei prodotti vegetali di IV gamma



I campioni di I gamma da sottoporre al trattamento (Tab.29), reperiti presso supermercati locali, sono indicati in tabella.

Tab. 29 Tipologie di prodotti sottoposti al processo di lavaggio	
Materia prima	Prodotto finito
Prezzemolo	Prezzemolo tritato

La materia prima è stata privata delle parti difettose e le foglie sono state tagliate in segmenti con l'ausilio di un coltello sterile affilato (98, 99, 100). Successivamente al processo di lavaggio i campioni sono stati asciugati attraverso centrifugazione, tritati e conservati in sacchetti sterili per *stomacker*.

La valutazione del processo di lavaggio ha previsto la misurazione del grado di abbattimento della concentrazione microbica nel prodotto finito. Le indagini microbiologiche, effettuate sia sulla materia prima che sul prodotto finito hanno riguardato la Conta mesofila e psicofila totale, *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* spp. (Tab.30).

<b>Tab.30 Metodi analitici di riferimento</b>	
<b>Metodica di riferimento</b>	<b>Parametro microbiologico</b>
UNI EN ISO 4833-1:2013	Conta mesofila totale a 30°C
UNI EN ISO 17410:2001	Conta microrganismi psicofili a 5°C
ISO 21528-2:2004	<i>Enterobacteriaceae</i>
UNI EN ISO 13720:2010	<i>Pseudomonas</i> spp.

### 6.13 Test statistici

Per l'analisi dei dati ottenuti nel corso della ricerca ci si è avvalsi dei seguenti test statistici:

1. Test del Chi quadrato ( $\chi^2$ ) di Pearson che valuta le differenze tra le proporzioni
2. Test del t di Student che valuta le differenze tra le medie.

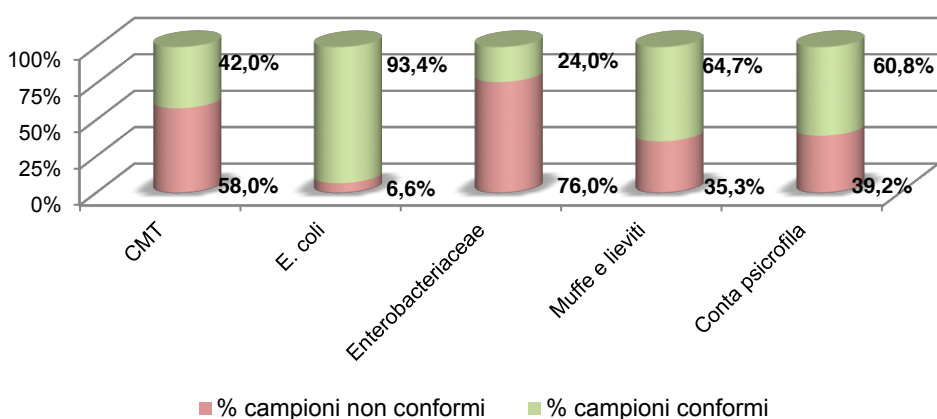
## CAPITOLO 7

### 7 Risultati

#### 7.2 Caratteristiche microbiologiche dei campioni vegetali di IV gamma

Il 58% dei 300 campioni esaminati ha mostrato valori di CMT superiori a  $5 \times 10^7$  UFC/g; nel 6.6% dei campioni sono stati misurati valori di *Escherichia coli* superiori a  $10^3$  UFC/g. Il 76% dei campioni ha evidenziato valori di *Enterobacteriaceae* superiori a  $10^4$  UFC/g. Muffe e lieviti hanno mostrato valori superiori a  $10^4$  UFC/g nel 35.3% dei campioni, mentre il 39.2% ha mostrato valori di Conta psicrofila superiori a  $5 \times 10^7$  UFC/g (Fig 29).

**Fig. 29 Percentuale di campioni con livelli di concentrazioni superiori ai limiti di riferimento**



I valori medi di concentrazione microbica delle differenti tipologie prese in esame sono indicati in Tab. 31.

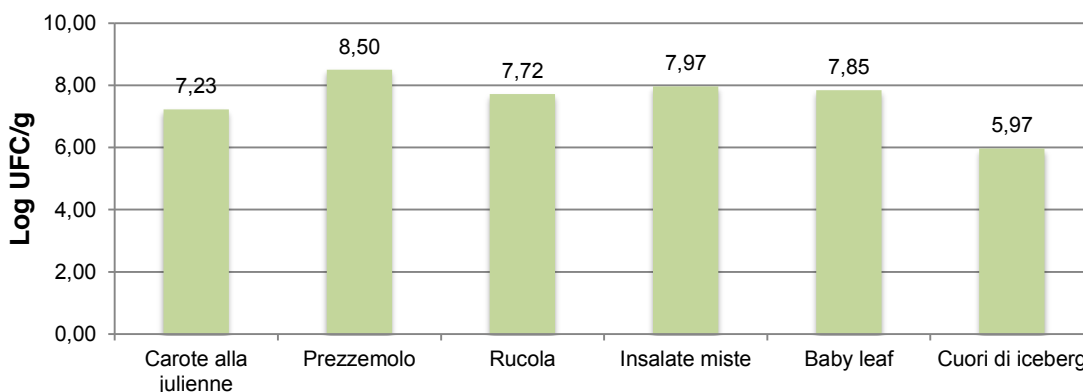
Tab. 31 Valori medi (Log UFC/g)  $\pm$  ds della concentrazione microbica nelle differenti tipologie di vegetali di IV gamma

	CMT	<i>Enterobacteriaceae</i>	Muffe e lieviti	<i>Pseudomonas</i> spp.	Conta psicrofila
<b>Carote alla julienne</b>	7.23 $\pm$ 0.75	6.09 $\pm$ 0.09	4.99 $\pm$ 0.84	3.65 $\pm$ 0.02	7.03 $\pm$ 0.02
<b>Prezzemolo</b>	8.50 $\pm$ 0.52	6.60 $\pm$ 0.07	3.41 $\pm$ 0.25	3.72 $\pm$ 0.05	9.43 $\pm$ 0.07
<b>Rucola</b>	7.72 $\pm$ 0.73	5.40 $\pm$ 0.17	3.66 $\pm$ 0.01	3.83 $\pm$ 0.09	7.30 $\pm$ 0.09
<b>Insalate miste</b>	7.97 $\pm$ 0.84	6.10 $\pm$ 0.23	4.15 $\pm$ 0.06	3.90 $\pm$ 0.03	7.46 $\pm$ 0.09
<b>"Baby leaf"</b>	7.85 $\pm$ 0.53	5.60 $\pm$ 0.26	4.02 $\pm$ 0.05	2.75 $\pm$ 0.04	7.66 $\pm$ 0.06
<b>Cuori di iceberg</b>	5.97 $\pm$ 0.19	4.16 $\pm$ 0.07	3.39 $\pm$ 0.03	NR	5.80 $\pm$ 0.04

NR= Non rilevato

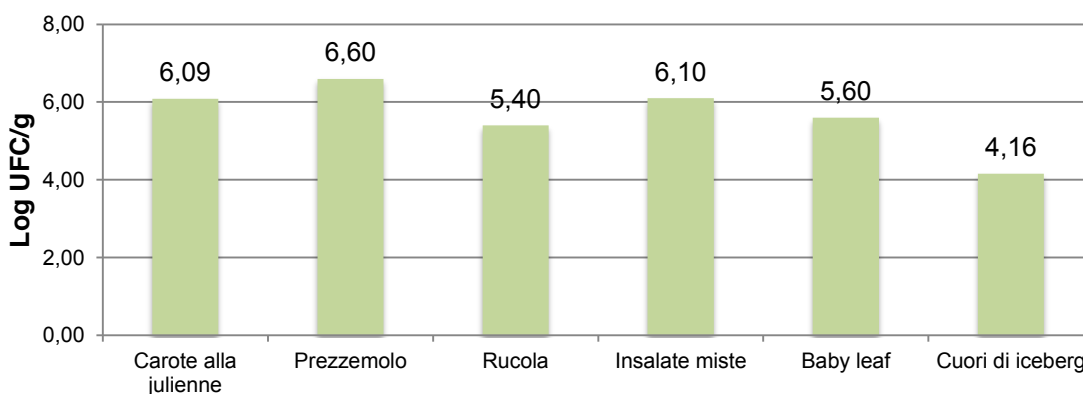
In relazione ai valori medi di concentrazione microbica espressi dalla CMT la tipologia di prodotto “Prezzemolo tritato” ha presentato risultati pari a 8.50 Log UFC/g, le “Insalate miste” 7.97 Log UFC/g, la tipologia di prodotto “*Baby leaf*” 7.85 Log UFC/g, la “Rucola” 7.72 Log UFC/g, le “Carote alla julienne” 7.23 Log UFC/g e la tipologia “Cuori di iceberg” 5.79 Log UFC/g (Fig. 30).

**Fig. 30 Concentrazioni medie di CMT**



I valori delle concentrazioni medie delle *Enterobacteriaceae* sono risultate pari a 6.60 Log UFC/g per il “Prezzemolo tritato”, 6.10 Log UFC/g per le “Insalate miste”, 6.09 Log UFC/g per le “Carote alla Julienne”, 5.60 Log UFC/g per la tipologia di prodotto “*Baby leaf*”, 5.40 Log UFC/g per la “Rucola” e 4.16 Log UFC/g per la tipologia di prodotto “Cuori di iceberg” 5.79 Log UFC/g (Fig. 31).

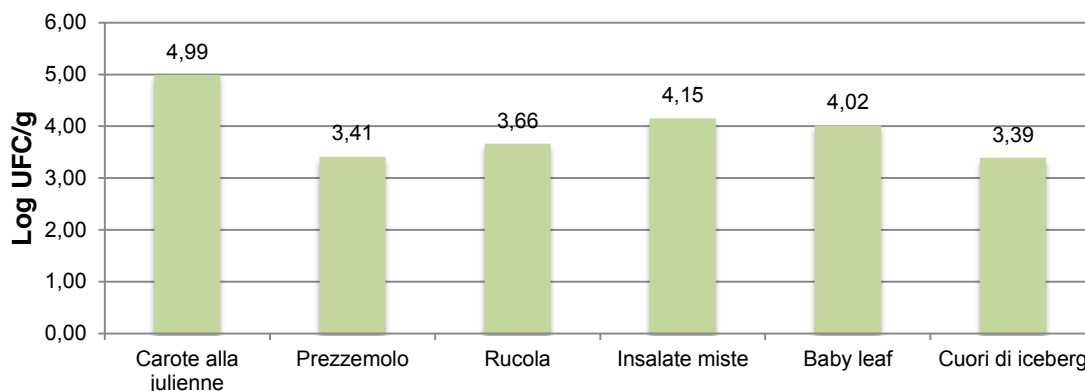
**Fig. 31 Contaminazione medie di *Enterobacteriaceae***



In relazione ai valori medi di concentrazione media di Muffe e lieviti, la tipologia di prodotto “Carote alla julienne” ha presentato risultati pari a 4.99 Log UFC/g, le “Insalate miste” 4.15 Log UFC/g, la tipologia di prodotto “*Baby leaf*” 4.02 Log UFC/g, la “Rucola” 3.66 Log

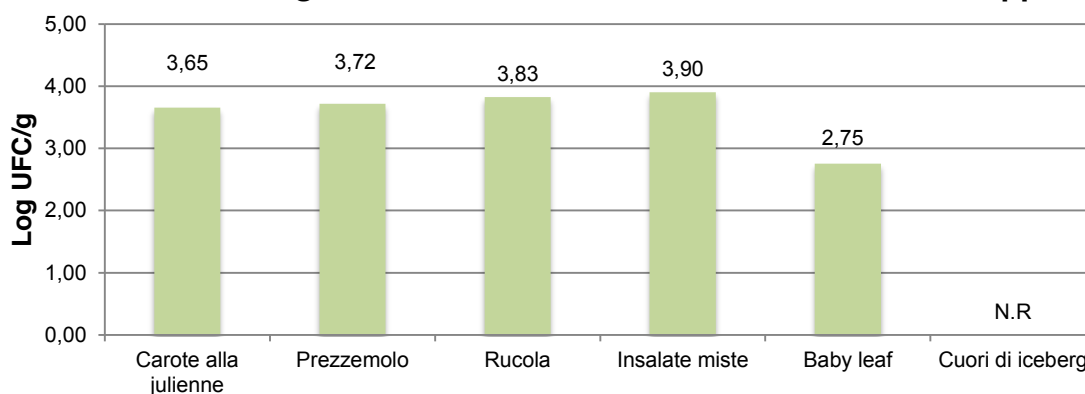
UFC/g, il “Prezzemolo tritato” 3.66 Log UFC/g e la tipologia “Cuori di iceberg” 3.39 Log UFC/g (Fig. 32).

**Fig. 32 Concentrazioni medie di Muffe e lieviti**



I valori delle concentrazioni medie di *Pseudomonas* spp. sono pari a 3.90 Log UFC/g per le “Insalate miste”, 3.83 Log UFC/g per la “Rucola”, 3.72 Log UFC/g per la tipologia di prodotto “Prezzemolo tritato”, 3.65 Log UFC/g per le “Carote alla Julienne” mentre per la tipologia “Cuori di iceberg” non è stato possibile quantificare il livello di contaminazione perché inferiore al limite di rilevabilità del metodo (<10 UFC/g)(Fig. 33).

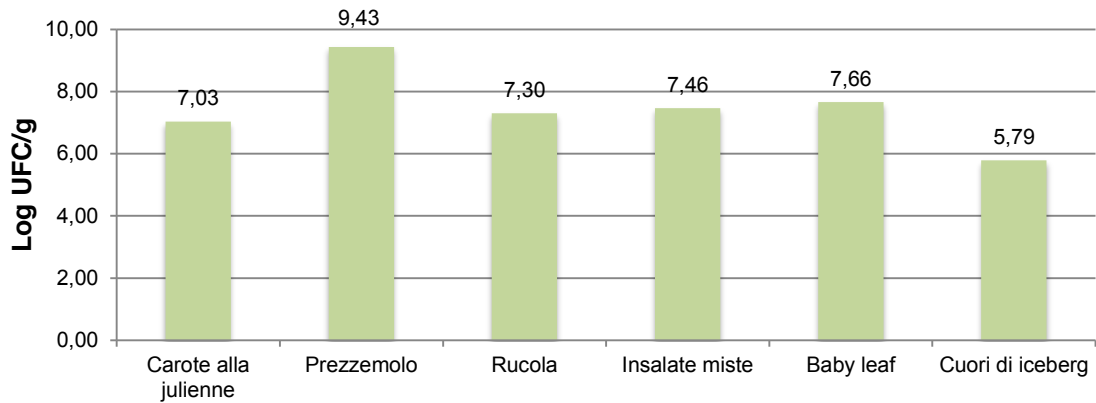
**Fig. 33 Concentrazioni medie di *Pseudomonas* spp.**



In relazione ai valori medi di concentrazione microbica espressi dalla Conta psicrofila, la tipologia di prodotto “Prezzemolo tritato” ha presentato risultati pari a 9.43 Log UFC/g, la tipologia di prodotto “Baby leaf” 7.66 Log UFC/g, le “Insalate miste” 7.46 Log UFC/g, la “Rucola” 7.30 Log UFC/g, le “Carote alla julienne” 7.03 Log UFC/g e la tipologia “Cuori di iceberg” 5.79 Log UFC/g (Fig. 34).



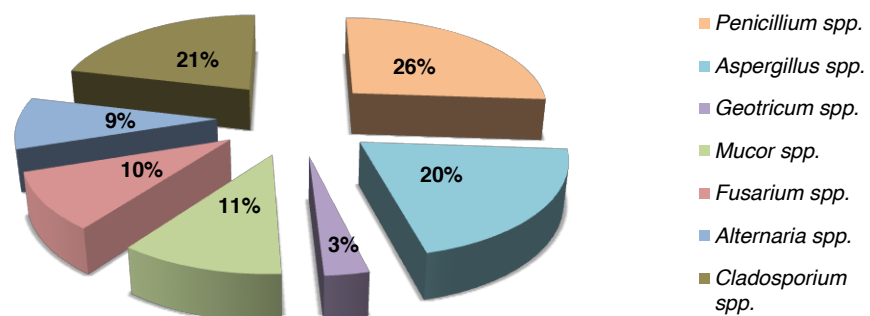
**Fig. 34 Concentrazioni medie di Conta psicrofila**



La valutazione della contaminazione dei prodotti ortofrutticoli di IV gamma ha previsto l'identificazione di specie in relazione a Muffe, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* e altri batteri Gram negativi, isolati nel corso della ricerca.

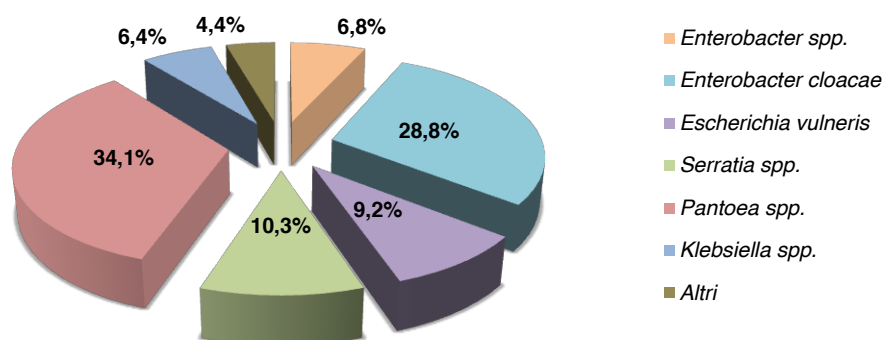
Le specie isolate con maggior frequenza sono risultate per le Muffe: *Penicillium spp.* (26%), *Cladosporium spp.* (20%), *Aspergillus spp.* (20%), *Mucor spp.* (12%), *Fusarium spp.* (10%), *Alternaria spp.* (9%) e *Geotricum* (3%) (Fig.35).

**Fig. 35 Muffe:**  
Frequenza degli isolamenti nei prodotti vegetali di IV gamma



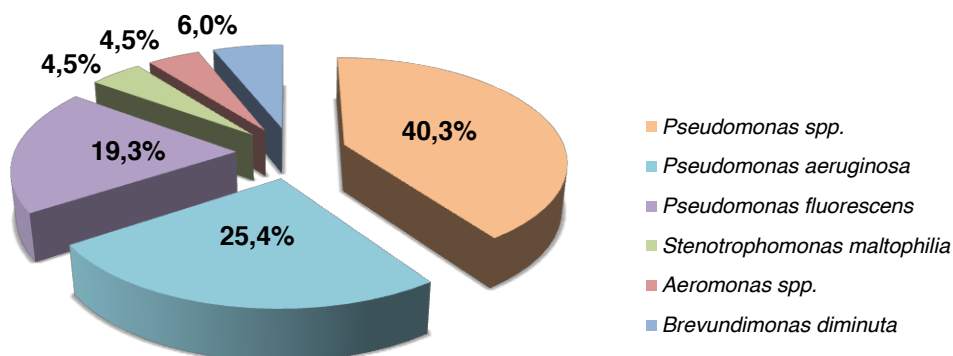
Le specie appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* isolate con maggior frequenza sono risultate: *Pantoea spp.* (34.1%), *Enterobacter cloacae* (28.8%), *Serratia spp.* (10.3%), *Escherichia vulneris* (9.2%), *Enterobacter spp.* (6.8%) e *Klebsiella spp.* (6.4%) (Fig. 36).

Fig. 36 Enterobacteriaceae:  
frequenza degli isolamenti nei prodotti vegetali di IV gamma



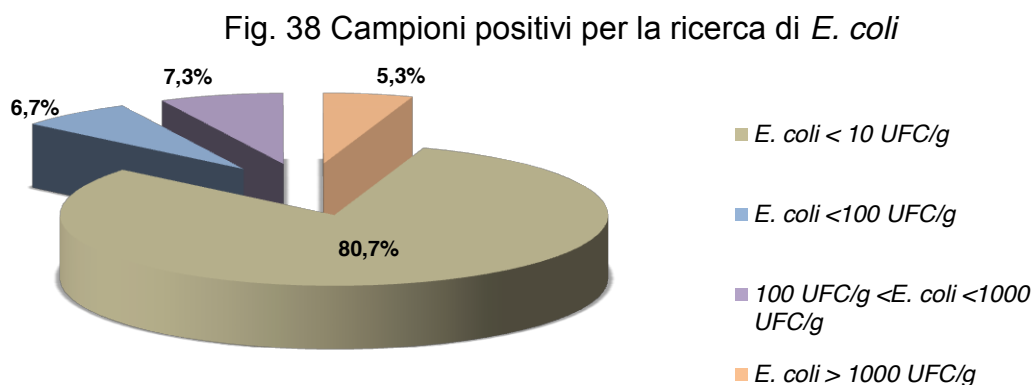
Le specie appartenenti alla famiglia delle *Pseudomonadaceae* e altri bastoncini Gram negativi, isolati con maggior frequenza, sono risultate: *Pseudomonas spp.* (40.3%), *Pseudomonas aeruginosa* (25.4%), *Pseudomonas fluorescens* (19.3%), *Brevundimonas diminuta* (6,0%), *Stenotrophomonas maltophilia* (4.5%) e *Aeromonas spp.* (4.5%) (Fig.37).

Fig. 37 *Pseudomonadaceae* e altri bastoncini Gram negativi:  
frequenza degli isolamenti nei prodotti vegetali di IV gamma



Il 19.3% dei campioni di vegetali di IV gamma sottoposti a indagine microbiologica, sono risultati contaminati da *Escherichia coli*. Nel 6.7% i livelli di contaminazione sono risultati inferiori a  $10^2$  UFC/g, il 5.3% ha mostrato valori di contaminazione compresi tra  $10^2$  e  $10^3$  UFC/g mentre il 7.3% ha mostrato valori superiori a  $10^3$  UFC/g.

Le tipologie di prodotti maggiormente contaminate da *E. coli* sono risultate il prezzemolo tritato, le insalate miste e la rucola ( $p < 0,05$ ) (Fig 38, Tab. 32).



**Tab. 32 Campioni positivi per la ricerca di *E.coli* ( UFC/g)**

	<10	<10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	>10 <sup>3</sup>
	N	N	N	N
Prezzemolo tritato	78	6	14	20
Insalate miste	69	12	2	2
Rucola	52	2	-	-
Insalate "Baby leaf"	45	-	-	-
Carote alla julienne	30	-	-	-
Cuori di iceberg	24	-	-	-
Totale	242 (80.7%)	20 (6.7%)	16 (5.3%)	22 (7.3%)

In nessuno dei campioni è stata isolata *Salmonella* spp, mentre un solo campione di rucola è risultato contaminato da *Listeria monocytogenes* alla concentrazione di  $4.4 \times 10^4$  UFC/g e *Yersinia enterocolitica*.

*Listeria* spp. (*L. seeligeri*, *L. ivanovii*) è stata isolata in cinque campioni di rucola.

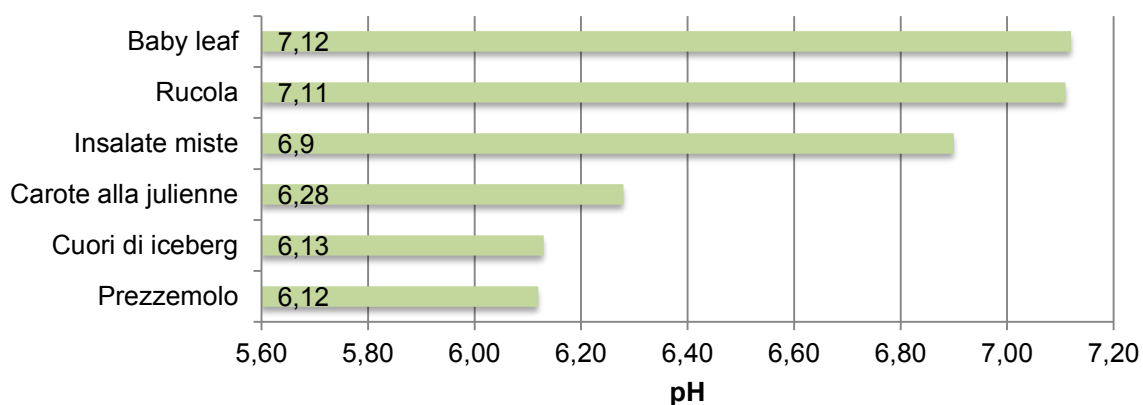
## Parametri ecologici

I valori della concentrazione idrogenionica (pH) rilevati nei campioni oggetto di studio hanno mostrato valori medi pari a  $6.61 \pm 0.02$  e valori medi di attività dell'acqua ( $A_w$ ) pari a  $0.977 \pm 0.001$  (Tab.33).

Tab. 33 Valori medi $\pm$ ds dei parametri ecologici	
Indagine analitica	Valori medi
pH	$6.61 \pm 0.02$
$A_w$	$0.977 \pm 0.001$

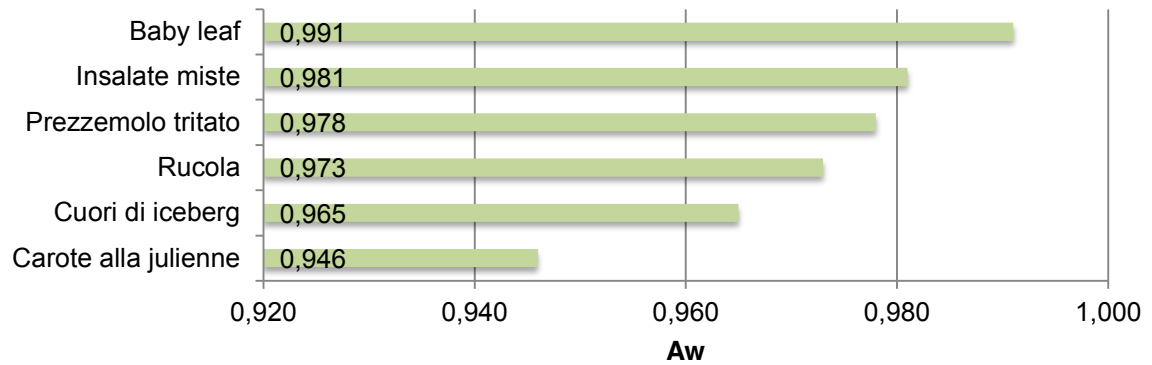
La tipologia di prodotto “*Baby leaf*” ha mostrato valori medi di pH pari a 7.12. Valori medi di pH pari a 7.11 sono stati riscontrati nella tipologia di prodotto “Rucola”, valori medi pari a 6.9 nelle “Insalate miste”, valori medi di pH pari a 6.28 nelle “Carote alla julienne”. I “cuori di iceberg” hanno mostrato valori medi di pH pari a 6.13, mentre il “Prezzemolo tritato” ha mostrato valori medi di pH pari a 6.12 (Fig. 39).

Fig. 39 Valori medi di pH nei vegetali di IV gamma



Valori medi di  $A_w$  pari a 0.991 sono stati registrati nella tipologia di prodotto “*Baby leaf*”, valori di  $A_w$  medi pari a 0.981 nelle “*Insalate miste*”, valori di  $A_w$  medi pari a 0.978 nel “*Prezzemolo tritato*”, valori medi pari a 0.973 nella “*Rucola*”, valori di  $A_w$  medi di 0.965 nei “*Cuori di iceberg*” e valori medi pari a 0.946 nelle “*Carote alla julienne*” (Fig. 40).

**Fig. 40 Valori medi di  $A_w$  nei vegetali di IV gamma**

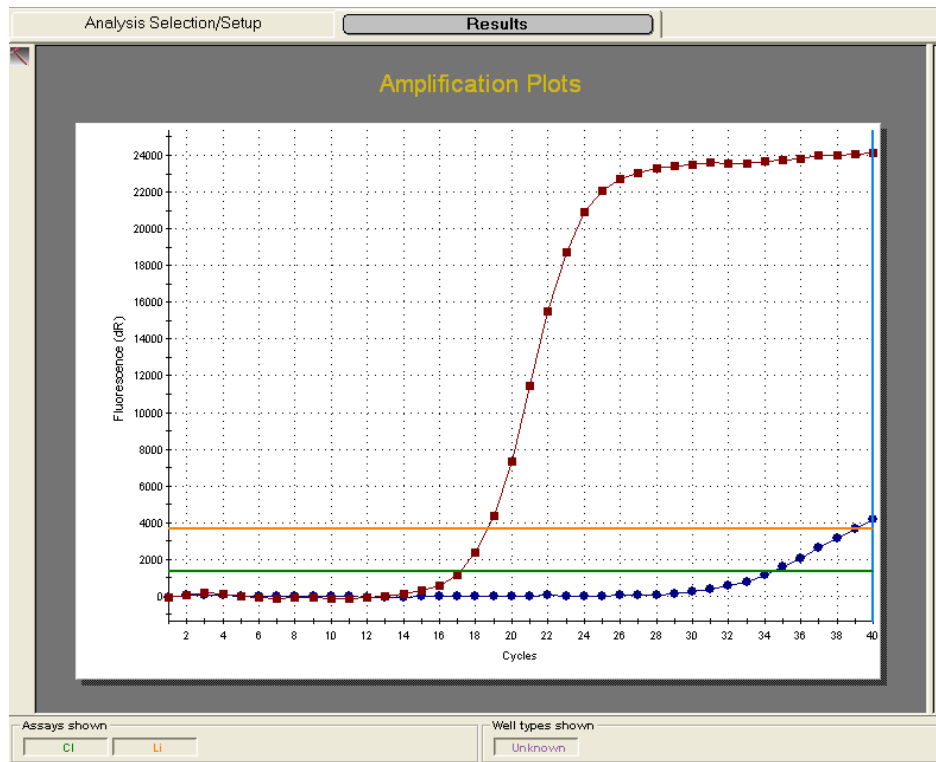


## 7.2 Analisi biomolecolari

### 7.2.1 Real time PCR

La PCR *real time*, eseguita per l'identificazione di *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ed *Escherichia coli* O157:H7 ha confermato i risultati ottenuti con il metodo colturale: un solo campione di rucola è risultato positivo per *Listeria monocytogenes* (Fig. 41).

Fig. 41 PCR real time positiva per *Listeria monocytogenes*



La ricerca dei principali determinanti di virulenza di *Listeria monocytogenes* ha evidenziato la presenza nel ceppo isolato dei geni *prfA*, *rrn*, *actA*, *inlA*, *inlB*, *iap*, *plcA* e *plcB* (Tab. 34).

Tab. 34 Geni di virulenza di *Listeria monocytogenes*

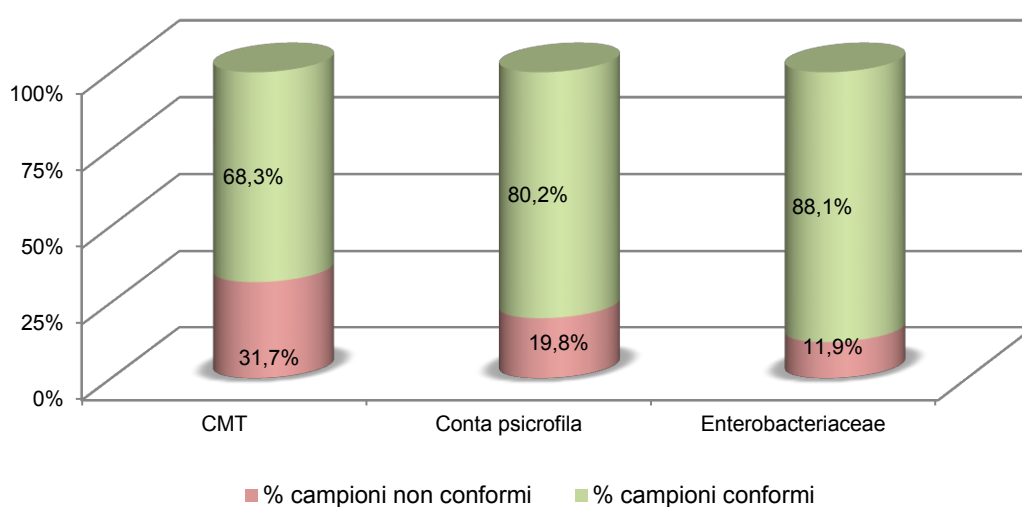
<i>prfA</i>	<i>rrn</i>	<i>hlyA</i>	<i>actA</i>	<i>inlA</i>	<i>inlB</i>	<i>iap</i>	<i>plcA</i>	<i>plcB</i>
+	+	-	+	+	+	+	+	+

In accordo con le indagini biomolecolari effettuate sui campioni alimentari, tutti i 38 ceppi di *Escherichia coli* isolati nel corso dello studio sono risultati "non O157:H7".

### 7.3 Caratteristiche microbiologiche dei campioni ambientali

Il 31,7% delle superfici analizzate, destinate e non destinate a venire a contatto con gli alimenti, hanno mostrato valori di CMT superiori a 100 UFC/cm<sup>2</sup>, l'11,9% valori di *Enterobacteriaceae* superiori a 100 UFC/cm<sup>2</sup>, mentre la conta psicrofila nel 19,8% dei casi ha superato 100 UFC/cm<sup>2</sup> (Fig. 42). *Escherichia coli* è risultato inferiore al limite di rilevabilità del metodo (<1 UFC/cm<sup>2</sup>).

**Fig. 42 Percentuale di superfici con livelli di concentrazioni superiori a 100 UFC/cm<sup>2</sup>**



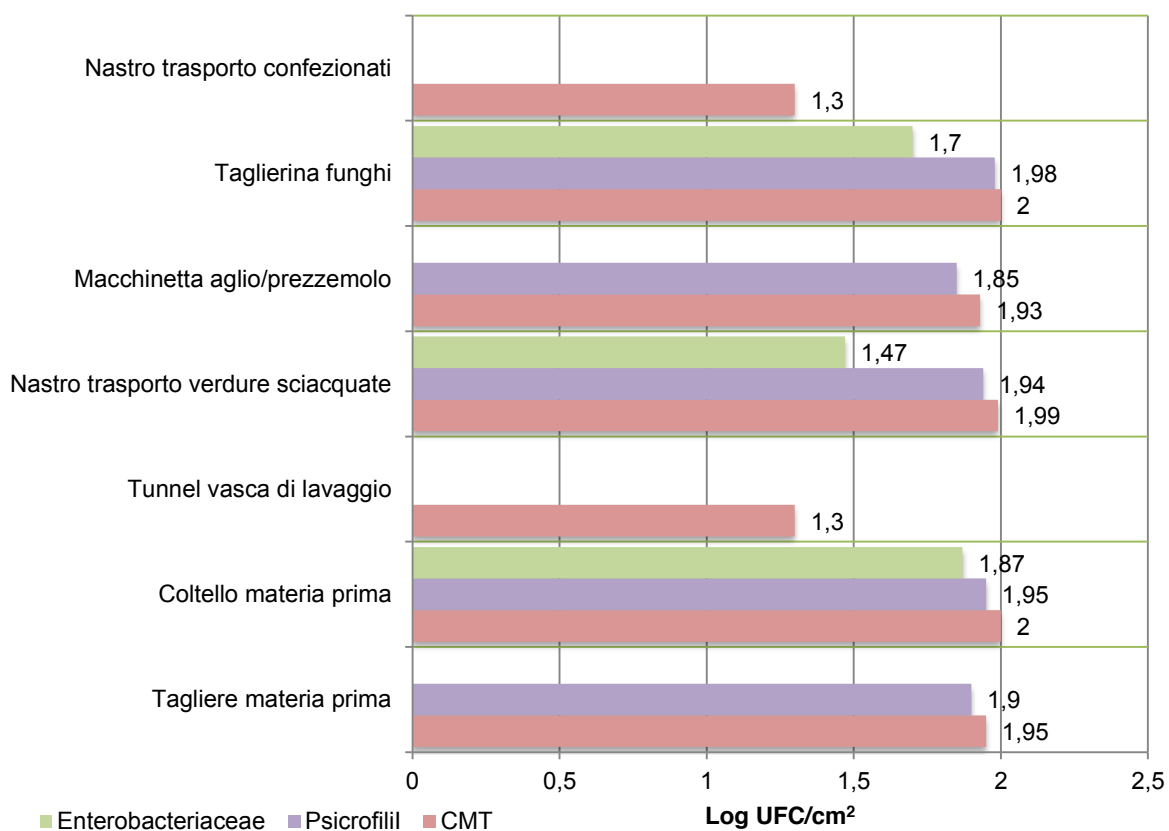
I valori medi di concentrazione microbica delle superfici campionate sono indicati in Tab. 35.

Tab. 35 Valori medi (UFC/cm <sup>2</sup> )± ds di concentrazione microbica nelle superfici			
SUPERFICI	CMT	Psicrofili	<i>Enterobacteriaceae</i>
Parete cella materia prima	<1	<1	<1
Tagliere materia prima	90 ± 6	80 ± 18	<1
Coltello materia prima	100 ± 12	90 ± 10	75 ± 8
Tunnel vasca di lavaggio	20 ± 5	<1	<1
Parete vasche lavaggio e risciacquo	<1	<1	<1
Nastro trasporto verdure lavate (1° fase)	<1	<1	<1
Nastro trasporto verdure rilavate (2° fase)	99 ± 15	89 ± 13	30 ± 7
Centrifuga (parete e cesta)	<1	<1	<1
Lavandino, Bacinelle prezzemolo	<1	<1	<1
Tritaverdure aglio/prezzemolo	86 ± 17	72 ± 10	<1
Taglierina funghi	100 ± 20	96 ± 17	50 ± 10
Piano di lavoro confezionati	<1	<1	<1
Nastro trasporto confezionati	30 ± 4	<1	<1

In relazione ai valori medi di concentrazione microbica (Fig.43), la superficie “Taglierina funghi” ha mostrato livelli di concentrazione media pari a 2 Log UFC/cm<sup>2</sup> per la CMT, 1.98 Log UFC/cm<sup>2</sup> Conta psicrofila e 1.7 Log UFC/cm<sup>2</sup> per le *Enterobacteriaceae*. Il “Nastro trasporto verdure sciacquate” ha mostrato livelli di concentrazioni media pari a 1.99 Log UFC/g per la CMT, 1.94 Log UFC/cm<sup>2</sup> per la Conta psicrofila e 1.47 Log UFC/cm<sup>2</sup> per le *Enterobacteriaceae*.

Il “Coltello materia prima” ha mostrato livelli di concentrazioni media pari a 2 Log UFC/cm<sup>2</sup> per la CMT, 1.95 Log UFC/cm<sup>2</sup> per la Conta psicrofila e 1.87 Log UFC/cm<sup>2</sup> per le *Enterobacteriaceae*. La tipologia di superficie “Tritaverdure aglio/prezzemolo” ha mostrato livelli di concentrazioni media pari a 1.93 Log UFC/cm<sup>2</sup> per la CMT e 1.85 Log UFC/cm<sup>2</sup> per la Conta psicrofila, il “Tagliere materia prima” ha mostrato livelli di concentrazione media pari a 1.95 Log UFC/cm<sup>2</sup> per la CMT, 1.90 Log UFC/cm<sup>2</sup> per la Conta psicrofila. Valori medi di CMT pari a 1.20 Log UFC/cm<sup>2</sup> sono stati evidenziati nel “Nastro trasporto confezionati”, mentre la tipologia di superficie denominata “Tunnel vasca di lavaggio” ha mostrato valori medi di CMT pari a 1.20 Log UFC/cm<sup>2</sup>.

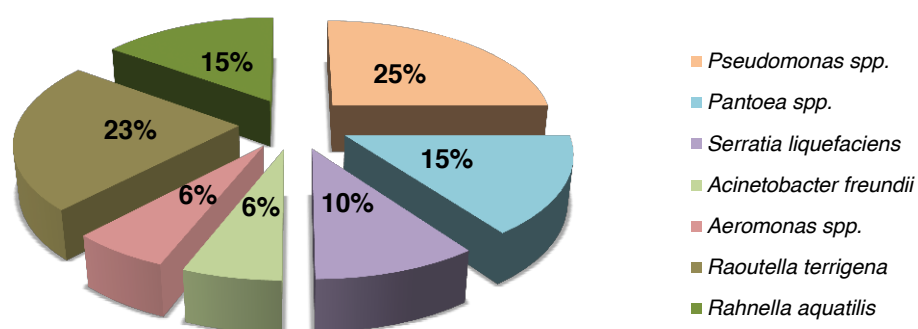
**Fig. 43 Valori medi di concentrazione delle superfici**





Dalla tipizzazione delle colonie ottenute dalla Conta mesofila totale (Fig. 44) è stata evidenziata con maggiore frequenza la presenza di: *Pseudomonas* spp. (25%), *Aeromonas* spp. (6%), *Pantoea* spp. (15%), *Serratia liquefaciens* (10%), *Raoutella terrigena* (23%), *Rahnella aquatilis* (15%).

Fig. 44 Superfici: specie isolate con maggior frequenza

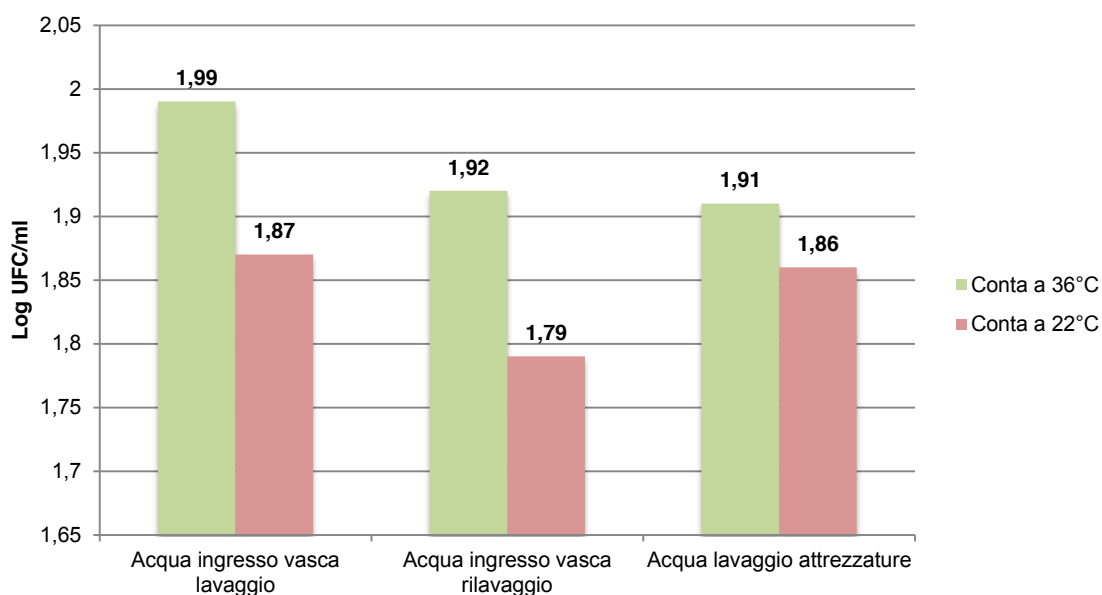


L'acqua all'ingresso della vasca lavaggio ha mostrato valori medi dei conteggi delle colonie a 36°C pari a 1.99 Log UFC/ml e pari a 1.87 Log UFC/ml per i conteggi delle colonie a 22°C. L'acqua all'ingresso della vasca di rilavaggio ha mostrato valori medi dei conteggi delle colonie a 36°C pari a 1.92 Log UFC/ml e pari a 1.79 Log UFC/ml per i conteggi delle colonie a 22°C, mentre l'acqua utilizzata all'interno degli stabilimenti per il lavaggio delle attrezzature ha mostrato valori medi dei conteggi delle colonie a 36°C pari a 1.91 Log UFC/ml e pari a 1.86 Log UFC/ml per i conteggi delle colonie a 22°C (Tab.36) ± ds dei conteggi a 36°C e 22°C nelle acque (Fig. 45).

La presenza dei principali indicatori di contaminazione (*E. coli*, *Enterococchi* e *Pseudomonas* spp.) non è stata evidenziata perché inferiore al limite di rilevabilità del metodo (<1 UFC/100ml).

Tab. 36 Valori medi (UFC/ml)± ds dei conteggi a 36°C e 22°C nelle acque		
	Conta a 36°C	Conta a 22°C
Acqua ingresso vasca lavaggio	98 ± 10	75 ± 12
Acqua ingresso vasca rilavaggio	84 ± 12	63 ± 7
Acqua lavaggio attrezzature	82 ± 9	72 ± 9

Fig. 45 Valori medi dei conteggi a 36°C e a 22°C nelle acque

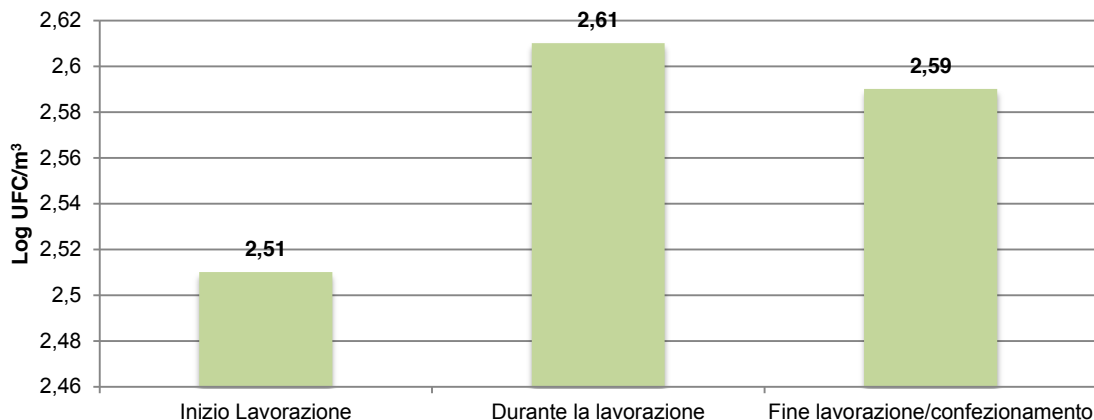


L'aria campionata presso gli ambienti di lavorazione ha mostrato valori di CMT medi pari a 2.51 Log UFC/m<sup>3</sup> nella fase corrispondente all'inizio della lavorazione. Durante la lavorazione i valori medi della concentrazione di CMT sono risultati pari a 2.61 Log UFC/m<sup>3</sup> e nella fase corrispondente alla "Fine lavorazione/confezionamento" sono state registrate concentrazioni medie di CMT pari a 2.59 Log UFC/m<sup>3</sup> (Tab. 37, Fig. 46).

Tab. 37 Valori medi (UFC/m<sup>3</sup>)± ds della CMT nell'aria

Inizio lavorazione	324 ± 5
In lavorazione	407 ± 8
Fine lavorazione/confezionamento	398 ± 7

Fig. 46 Valori medi di CMT nell'aria



## 7.4 Shelf life

L'evoluzione delle concentrazioni microbiche evidenziate nel corso della vita conservativa del prodotto sono indicate nella Tab. 38 e nella Fig. 47.

Tab. 38 Evoluzione delle concentrazioni microbiche medie  $\pm$  ds (Log UFC/g) nel corso della vita conservativa delle Insalate miste.

	CMT	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	Conta psicrofila
<b>T0</b>	5.71 $\pm$ 0.03	4.15 $\pm$ 0.50	2.52 $\pm$ 0.05	5.02 $\pm$ 0.27
<b>T1 (3 gg)</b>	6.13 $\pm$ 0.33	4.85 $\pm$ 0.09	2.91 $\pm$ 0.51	5.68 $\pm$ 0.02
<b>T2 (7gg)</b>	6.18 $\pm$ 0.11	4.89 $\pm$ 0.07	3.70 $\pm$ 0.20	6.54 $\pm$ 0.13
<b>T3 (9gg)</b>	7.36 $\pm$ 0.15	5.15 $\pm$ 0.26	4.35 $\pm$ 0.04	7.29 $\pm$ 0.17

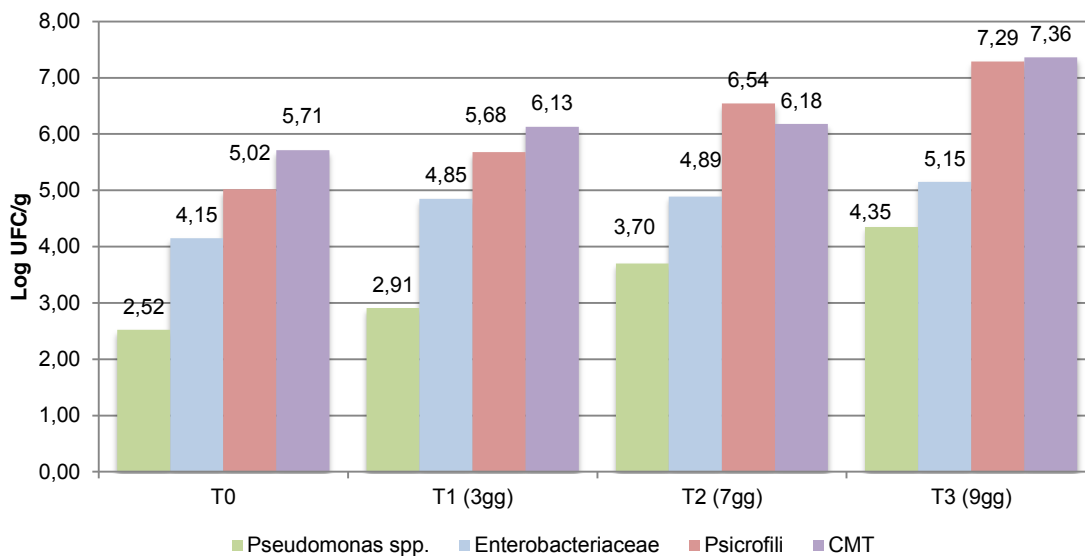
Le concentrazioni medie di CMT hanno mostrato valori medi pari a 5.71 Log UFC/g al tempo T0 corrispondente al momento della produzione, valori medi pari a 6.13 Log UFC/g al tempo T1, corrispondente a 3 giorni di vita conservativa del prodotto, valori medi pari a 6.18 Log UFC/g al tempo T2 corrispondente alla fine della vita conservativa dichiarata dai produttori in etichetta (7 giorni) e valori medi pari a 7.36 Log UFC/g al tempo T3, corrispondente al nono giorno dal momento della produzione.

Le concentrazioni medie di *Enterobacteriaceae* hanno mostrato valori medi pari a 4.15 Log UFC/g al tempo T0, valori medi pari a 4.85 Log UFC/g al tempo T1, valori medi pari a 4.89 Log UFC/g al tempo T2 corrispondente alla fine della vita conservativa dichiarata dai produttori in etichetta (7 giorni) e valori medi pari a 5.15 Log UFC/g al tempo T3.

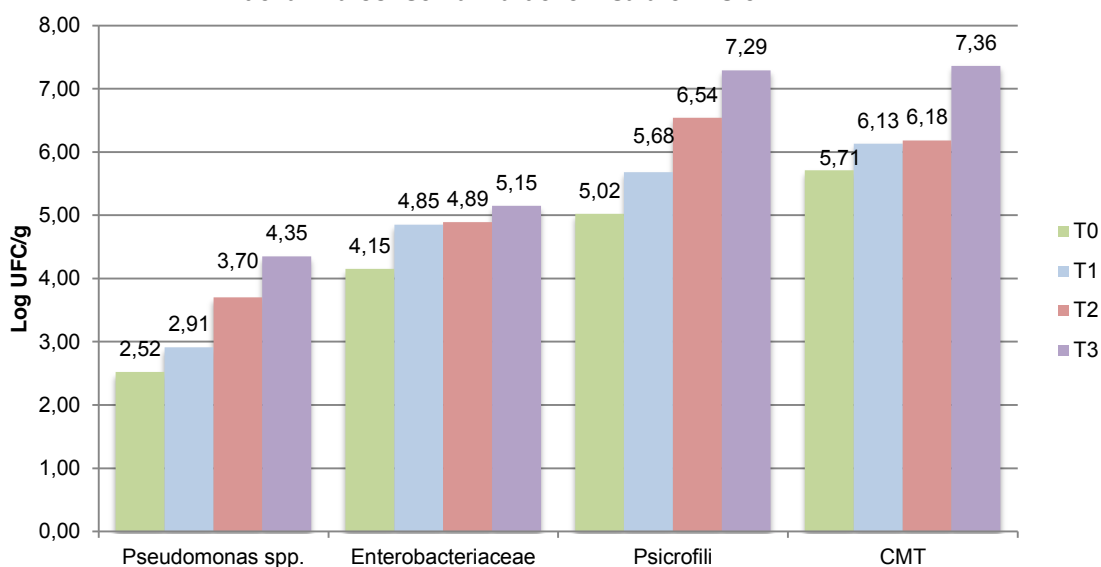
Le concentrazioni medie di *Pseudomonas* spp. hanno mostrato valori medi pari a 2.52 Log UFC/g al tempo T0, valori medi pari a 2.91 Log UFC/g al tempo T1, valori medi pari a 3.70 Log UFC/g al tempo T2 corrispondente alla fine della vita conservativa dichiarata dai produttori in etichetta (7 giorni) e valori medi pari a 4.35 Log UFC/g al tempo T3.

Le concentrazioni medie della *Conta psicrofila* hanno mostrato valori medi pari a 5.02 Log UFC/g al tempo T0, valori medi pari a 5.68 Log UFC/g al tempo T1, valori medi pari a 6.54 Log UFC/g al tempo T2 corrispondente alla fine della vita conservativa dichiarata dai produttori in etichetta (7 giorni) e valori medi pari a 7.29 Log UFC/g al tempo T3.

**Fig. 47A Evoluzione delle concentrazioni microbiche medie nel corso della vita conservativa delle Insalate miste**



**Fig. 47B Evoluzione delle concentrazioni microbiche medie nel corso della vita conservativa delle Insalate miste**



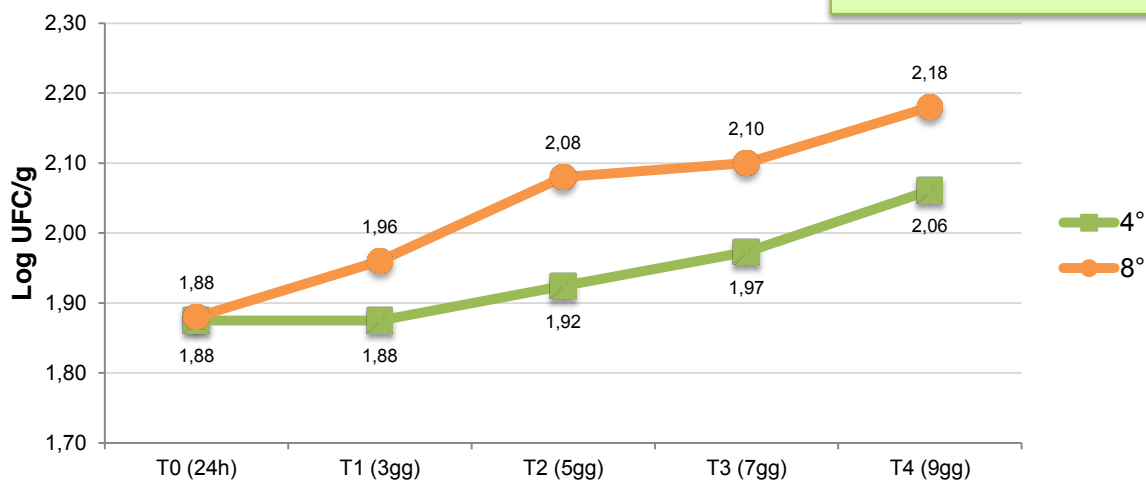
## 7.5 Challenge test

I valori medi relativi alla crescita di *Listeria monocytogenes* in differenti tipologie di vegetali di IV gamma, ottenuti attraverso *Challenge test*, sono riportati nella Tab.39.

Tab. 39 Valori medi (Log UFC/G) di <i>Listeria monocytogenes</i> nei vegetali di IV gamma					
Prezzemolo tritato			Prezzemolo intero		
	4°C	8°C		4°C	8°C
T0	1.88 ± 0.10	1.88 ± 0.10		1.85 ± 0.06	1.85 ± 0.06
T1	1.88 ± 0.27	1.96 ± 0.34		1.88 ± 0.08	1.95 ± 0.1
T2	1.92 ± 0.06	2.08 ± 0.45		1.88 ± 0.07	1.98 ± 0.12
T3	1.97 ± 0.33	2.10 ± 0.08		1.92 ± 0.11	2.02 ± 0.08
T4	2.06 ± 0.3	2.18 ± 0.22		1.92 ± 0.14	2.26 ± 0.15
Potenziale di crescita (δ= Log UFC/g T4- Log UFC/g T0)	0.18	0.30	Potenziale di crescita (δ= Log UFC/g T4- Log UFC/g T0)	0.07	0.41
Carote alla Julienne			Insalate miste		
	4°C	8°C		4°C	8°C
T0	2.01 ± 0.01	2 ± 0.01		2 ± 0.15	2 ± 0.15
T1	2 ± 0.01	2 ± 0.02		2 ± 0.09	2.85 ± 0.05
T2	2.01 ± 0.02	2 ± 0.01		2.85 ± 0.21	3 ± 0.15
T3	2.01 ± 0.01	2 ± 0.01		3 ± 0.06	3.26 ± 0.1
T4	2.01 ± 0.01	2.02 ± 0.02		3.18 ± 0.10	3.26 ± 0.08
Potenziale di crescita (δ= Log UFC/g T4- Log UFC/g T0)	0.01	0.02	Potenziale di crescita (δ= Log UFC/g T4- Log UFC/g T0)	1.18	1.26
Rucola intera			Rucola tritata		
	4°C	8°C		4°C	8°C
T0	2 ± 0.26	2 ± 0.26		1.47 ± 0.15	1.47 ± 0.15
T1	2 ± 0.51	3.18 ± 0.43		1.47 ± 0.23	2.25 ± 0.09
T2	2.18 ± 0.06	3.33 ± 0.08		2.25 ± 0.10	3.07 ± 0.10
T3	2.30 ± 0.6	3.45 ± 0.21		2.47 ± 0.30	4.27 ± 0.35
T4	2.48 ± 0.19	3.55 ± 0.32		2.47 ± 0.8	4.88 ± 0.08
Potenziale di crescita (δ= Log UFC/g T4- Log UFC/g T0)	0.48	1.55	Potenziale di crescita (δ= Log UFC/g T4- Log UFC/g T0)	1	3.41

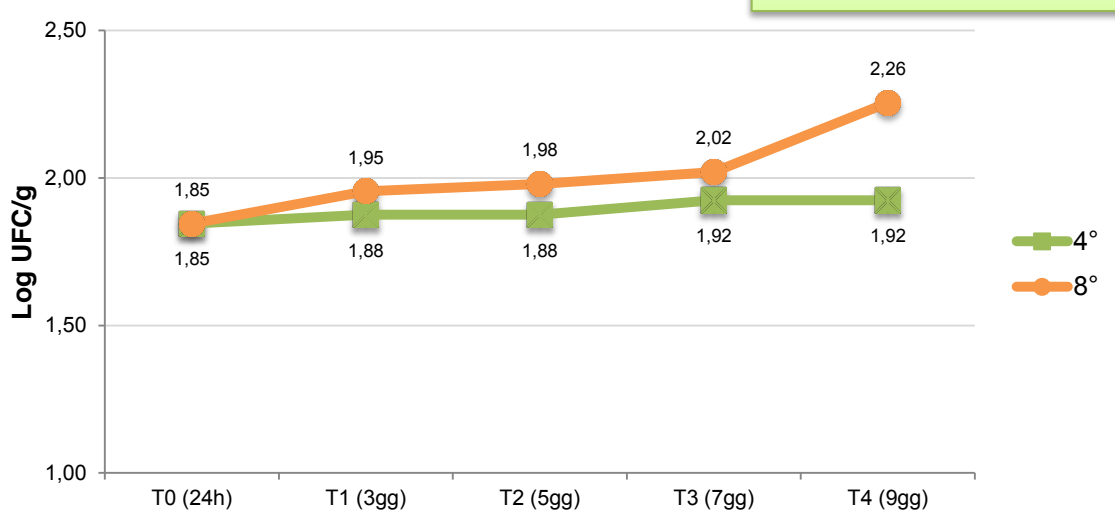
La concentrazione media di *L. monocytogenes* inoculata nel “Prezzemolo tritato” mostra l’andamento illustrato nella Fig. 48. Nei campioni conservati alla temperatura di 4 ± 2°C sono state osservate concentrazioni medie iniziali (T0) di *L. monocytogenes* pari a 1.88 Log UFC/g, mentre al tempo finale T4 la concentrazione media osservata è stata di 2.06 Log UFC/g con una differenza di potenziale di crescita pari a 0.18 Log UFC/g. I campioni conservati alla temperatura di 8 ± 2°C hanno evidenziato al tempo T0 concentrazioni medie di *L. monocytogenes* pari a 1.88 Log UFC/g, mentre al tempo finale T4 la concentrazione media osservata è stata di 2.18 Log UFC/g con una differenza di potenziale di crescita pari a 0.3 Log UFC/g.

**Fig. 48 Challenge test di *Listeria monocytogenes*  
"Prezzemolo tritato"**

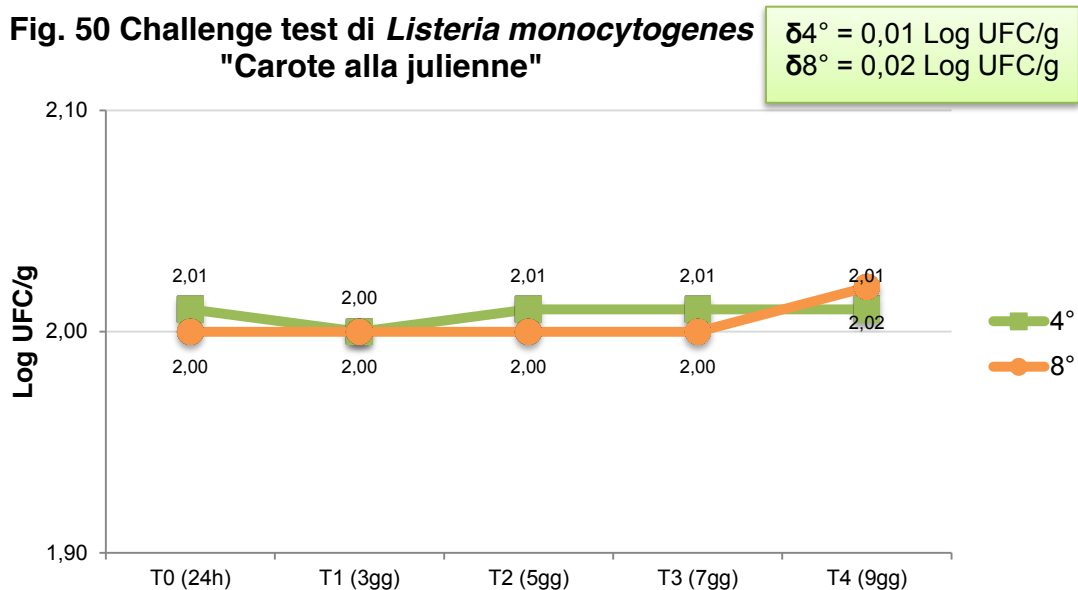


Il comportamento di *L. monocytogenes* nella matrice "Prezzemolo intero" mostra l'andamento illustrato nella Fig.49. Nei campioni conservati alla temperatura di  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  sono state osservate, al tempo "T0", concentrazioni medie di *L. monocytogenes* pari a 1.85 Log UFC/g, mentre al tempo finale "T4" la concentrazione media osservata è stata di 1.92 Log UFC/g con una differenza di potenziale di crescita pari a 0.07 Log UFC/g. I campioni conservati alla temperatura di  $8 \pm 2^{\circ}\text{C}$  hanno evidenziato concentrazioni iniziali (T0) medie di *L. monocytogenes* pari a 1.85 Log UFC/g, mentre al tempo finale T4 la concentrazione media osservata è stata di 2.26 Log UFC/g con una differenza di potenziale di crescita pari a 0.41 Log UFC/g.

**Fig. 49 Challenge test di *Listeria monocytogenes*  
"Prezzemolo intero"**

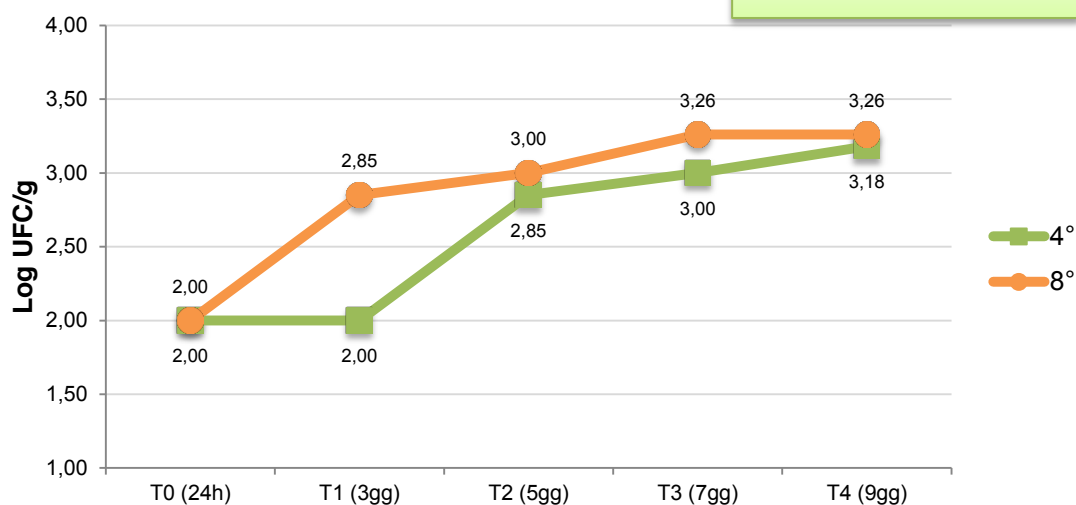


Il comportamento di *L. monocytogenes* nelle “Carote alla julienne” mostra l’andamento illustrato nella Fig. 50. Nei campioni conservati alla temperatura di  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  sono state osservate concentrazioni medie iniziali (T0) di *L. monocytogenes* pari a 2.01 Log UFC/g. Tali concentrazioni sono risultate costanti per tutto il corso dello studio, mostrando al tempo finale T4 valori pari a 2.01 Log UFC/g con una differenza di potenziale di crescita pari a 0.01 Log UFC/g. Un comportamento analogo è stato osservato anche alla temperatura di  $8\pm 2^{\circ}\text{C}$  dove le concentrazioni medie al T0 sono pari a 2.00 Log UFC/g e al tempo finale T4 pari a 2.02 Log UFC/g con una differenza di potenziale di crescita pari a 0.02 Log UFC/g.



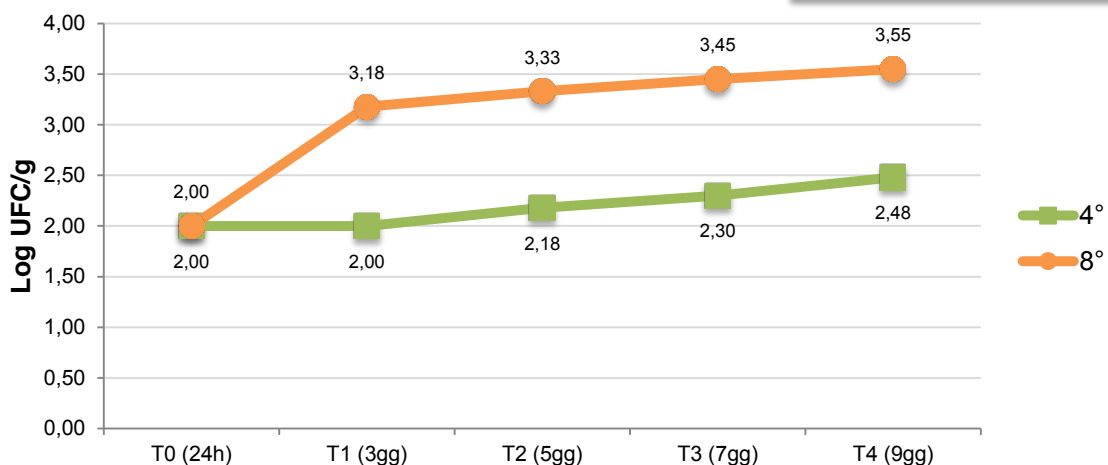
La concentrazione media di *L. monocytogenes* inoculata nelle “Insalate miste” ha mostrato l’andamento illustrato nella Fig. 51. Per quanto concerne i campioni conservati alla temperatura di  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ , al tempo iniziale T0, sono state osservate concentrazioni medie di *L. monocytogenes* pari a 2 Log UFC/g, mentre al tempo finale T4 la concentrazione media osservata è stata di 3.18 Log UFC/g con una differenza di potenziale di crescita ( $\delta = \text{Log UFC/g T4} - \text{Log UFC/g T0}$ ) pari a 1.18 Log UFC/g. I campioni conservati alla temperatura di  $8\pm 2^{\circ}\text{C}$  hanno evidenziato concentrazioni medie di *L. monocytogenes* pari a 2 Log UFC/g, mentre al tempo finale T4 la concentrazione media osservata è stata di 3.26 Log UFC/g con una differenza di potenziale di crescita pari a 1.26 Log UFC/g.

**Fig. 51 Challenge test di *Listeria monocytogenes* "Insalata mista"**



La concentrazione media di *L. monocytogenes* sperimentalmente inoculata nella “Rucola intera” mostra l’andamento illustrato nella Fig. 52. Per quanto concerne i campioni conservati alla temperatura di  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ , al tempo iniziale T0, sono state osservate concentrazioni medie di *L. monocytogenes* pari a 2 Log UFC/g, mentre al tempo finale T4 la concentrazione media osservata è stata di 2,48 Log UFC/g con una differenza di potenziale di crescita pari a 0,48 Log UFC/g. I campioni conservati alla temperatura di  $8 \pm 2^\circ\text{C}$  hanno evidenziato concentrazioni medie di *L. monocytogenes* pari a 2 Log UFC/g, mentre al tempo finale T4 la concentrazione media osservata è stata di 3,55 Log UFC/g con una differenza di potenziale di crescita pari a 1,55 Log UFC/g.

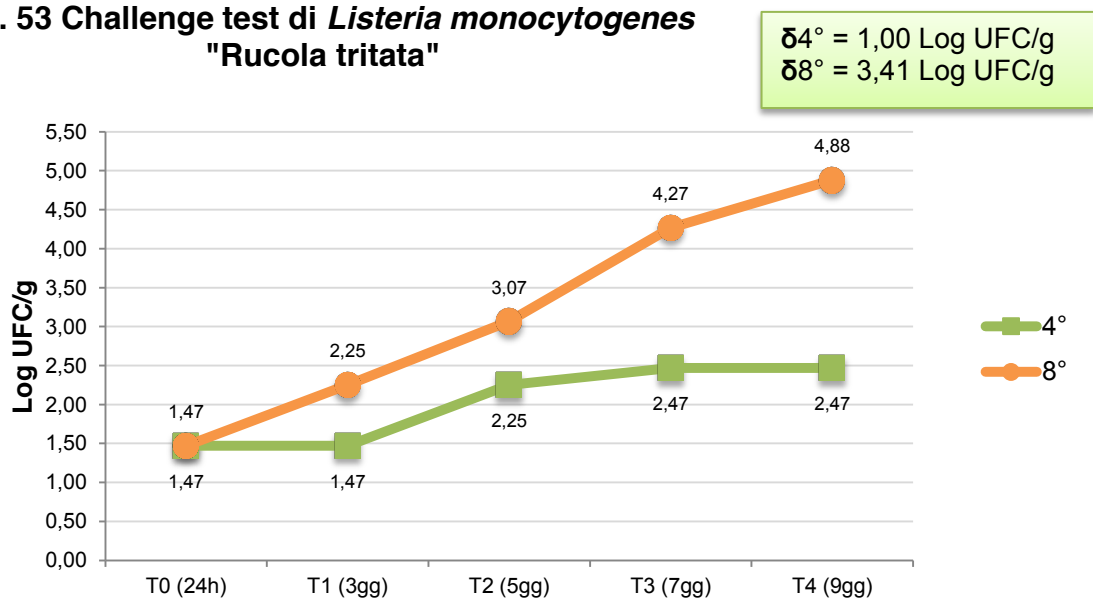
**Fig. 52 Challenge test di *Listeria monocytogenes* "Rucola"**





La concentrazione media di *L. monocytogenes* inoculata nella “Rucola tritata” mostra l’andamento illustrato nella Fig. 53. Per quanto concerne i campioni conservati alla temperatura di  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ , al tempo iniziale T0, sono state osservate concentrazioni medie di *L. monocytogenes* pari a 1.47 Log UFC/g, mentre al tempo finale T4 la concentrazione media osservata è stata di 2.47 Log UFC/g con una differenza di potenziale di crescita pari a 1 Log UFC/g. I campioni conservati alla temperatura di  $8\pm 2^{\circ}\text{C}$  hanno evidenziato concentrazioni medie di *L. monocytogenes* pari a 1.47 Log UFC/g, mentre al tempo finale T4 la concentrazione media osservata è stata di 4.88 Log UFC/g con una differenza di potenziale di crescita pari a 3.41 Log UFC/g.

**Fig. 53 Challenge test di *Listeria monocytogenes* "Rucola tritata"**



La misurazione dei fattori intrinseci nei prodotti esaminati (pH e l’ $A_w$ ), ha mostrato valori compresi tra 5.91 e 7.34. L’attività dell’acqua ha mostrato valori compresi tra 0.980 e 0.992.

## 7.6 Determinazione della MIC e della MBC di Sostanze con potenziale attività antimicrobica.

In relazione alla valutazione della concentrazione minima inibente e battericida di Cumarina e Apiolo, non sono stati evidenziati risultati di attività antimicrobica nei confronti di *L. monocytogenes*.

## 7.7 Challenge test biomolecolari.

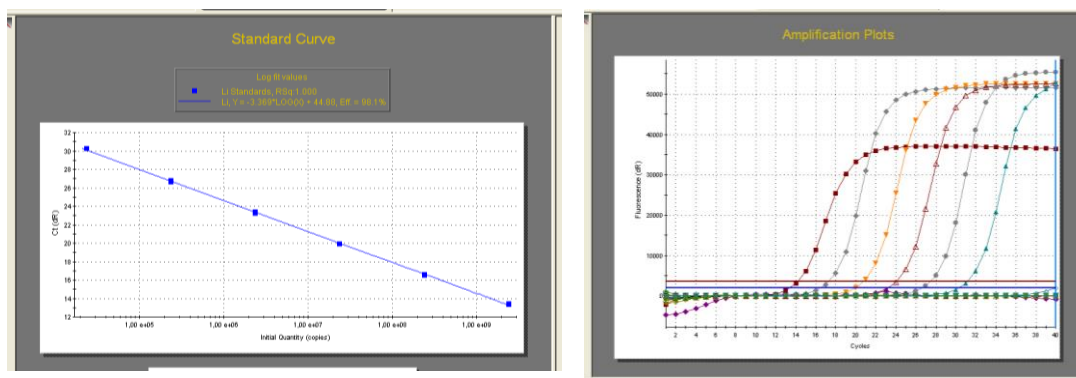
La valutazione della crescita di *Listeria monocytogenes* attraverso “PMA Real-time PCR” ha permesso, relativamente ai *Challenge test* effettuati sulla tipologia di prodotto “Prezzemolo tritato”, di ottenere i valori medi di concentrazione delle Unità Genomiche (UG) indicati nella Tab. 40.

Tab. 40. *Challenge test* biomolecolari: valori medi (Log UG/g) di *Listeria monocytogenes* nel prezzemolo tritato.

	4°C	8°C
T0	2.43 ± 0.21	2.43 ± 0.21
T1	2.45 ± 0.16	2.43 ± 0.19
T2	2.45 ± 0.09	2.52 ± 0.11
T3	2.48 ± 0.15	2.62 ± 0.19
T4	2.53 ± 0.11	2.73 ± 0.02

La rilevazione e quantificazione assoluta della concentrazione del gene *ftsZ* di *L. monocytogenes* nei campioni, è stata effettuata attraverso la costruzione di una curva standard in corrispondenza di ogni seduta analitica per realizzare, tramite il software “mx Pro” (Stratagene), le rette standard di riferimento (Fig. 54).

Fig. 54 Curva standard

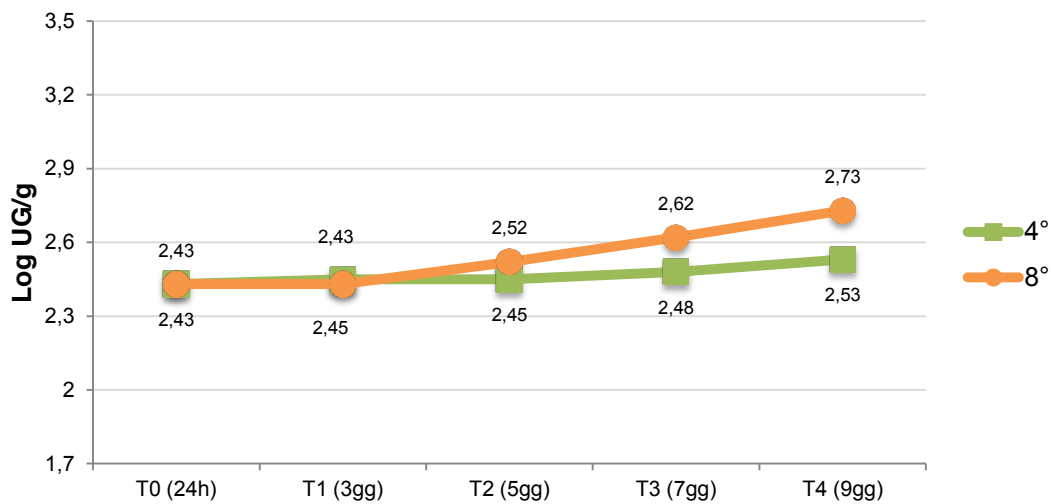


La concentrazione media del gene *ftsZ*, nei campioni conservati alla temperatura di  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  è risultata pari a 2.43 Log UG/g al tempo iniziale (T0), al terzo e al quinto giorno successivo al momento dell'inoculo (T1 e T2) i valori medi sono risultati in entrambi i tempi pari a 2.45

Log UG/g. In corrispondenza del settimo giornodal momento dell'inoculo(T3), la concentrazione media del gene *ftsZ* è risultata pari a 2.48 Log UG/g, mentre, la concentrazione media osservata in corrispondenza del tempo finale (T4) è risultata pari a 2.53 Log UG/g.

Per quanto concerne i campioni conservati alla temperatura di  $8\pm 2^{\circ}\text{C}$ , la concentrazione media del gene *ftsZ*, è risultata pari a 2.43 Log UG/g sia al tempo iniziale (T0) che dopo il terzo giorno (T1), pari a 2.53 Log UG/g dopo 5 giorni (T2), pari a 2.62 Log UG/g in corrispondenza del settimo giorno (T3) e pari a 2.73 Log UG/g in corrispondenza del non giorno (T4) (Fig.55).

**Fig. 55 Challenge test biomolecolari di *Listeria monocytogenes* nel Prezzemolo tritato**



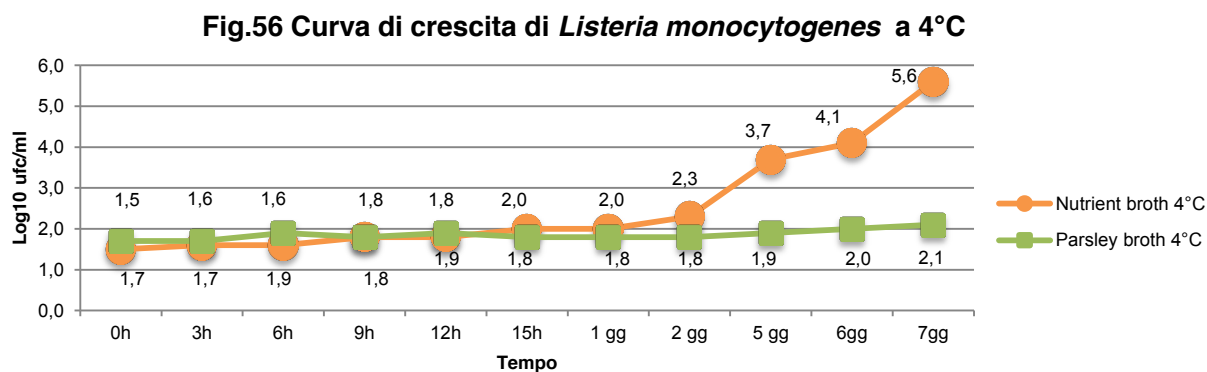
## 7.8 Curve di crescita

I valori medi relativi alla crescita di *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* in assenza di fenomeni di competizione con altre specie microbiche, sono stati esaminati attraverso l'allestimento di curve di crescita in "Parsley Broth" (Tab. 41).

Tab. 41 Valori medi  $\pm$  ds (Log UFC/ml) delle curve di crescita di *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa* in Parsley Broth.

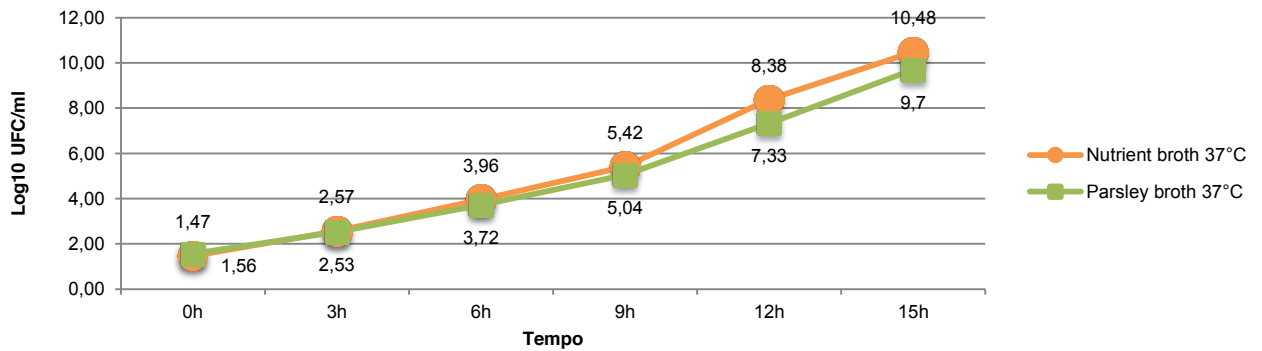
	<i>Listeria monocytogenes</i>				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	Parsley Broth		Nutrient broth		Parsley Broth		Nutrient broth	
	4°C	37°C	4°C	37°C	4°C	37°C	4°C	37°C
0h	1.7 $\pm$ 0.08	1.56 $\pm$ 0.05	1.5 $\pm$ 0.07	1.47 $\pm$ 0.08	2.43 $\pm$ 0.04	2.43 $\pm$ 0.04	2.43 $\pm$ 0.02	2.32 $\pm$ 0.03
3h	1.7 $\pm$ 0.07	2.53 $\pm$ 0.05	1.6 $\pm$ 0.09	2.57 $\pm$ 0.03	2.62 $\pm$ 0.05	3.01 $\pm$ 0.09	2.5 $\pm$ 0.03	2.78 $\pm$ 0.02
6h	1.9 $\pm$ 0.07	3.72 $\pm$ 0.03	1.6 $\pm$ 0.08	3.96 $\pm$ 0.02	2.57 $\pm$ 0.06	3.81 $\pm$ 0.04	2.65 $\pm$ 0.05	3.66 $\pm$ 0.05
9h	1.8 $\pm$ 0.05	5.04 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.07	5.42 $\pm$ 0.08	2.80 $\pm$ 0.09	6.11 $\pm$ 0.02	2.74 $\pm$ 0.06	4.93 $\pm$ 0.02
12h	1.9 $\pm$ 0.07	7.33 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.05	8.38 $\pm$ 0.05	2.83 $\pm$ 0.07	8.79 $\pm$ 0.01	2.78 $\pm$ 0.04	7.76 $\pm$ 0.05
15h	1.8 $\pm$ 0.08	9.7 $\pm$ 0.06	2.0 $\pm$ 0.04	10.48 $\pm$ 0.02	2.85 $\pm$ 0.05	10.98 $\pm$ 0.02	2.91 $\pm$ 0.05	9.65 $\pm$ 0.04
24h	1.8 $\pm$ 0.09	-	2.0 $\pm$ 0.08	-	-	-	-	-
2gg	1.8 $\pm$ 0.08	-	2.3 $\pm$ 0.05	-	-	-	-	-
5gg	1.9 $\pm$ 0.09	-	3.7 $\pm$ 0.05	-	-	-	-	-
6gg	2.0 $\pm$ 0.06	-	4.1 $\pm$ 0.01	-	-	-	-	-
7gg	2.1 $\pm$ 0.03	-	5.6 $\pm$ 0.09	-	-	-	-	-

Alla temperatura di 4°C, la concentrazione media di *L. monocytogenes* nel Parsley Broth rimane, nell'intervallo di tempo considerato, al di sotto di 2.1 Log UFC/ml. Al momento dell'inoculo la concentrazione media è risultata pari a 1.7 Log UFC/ml, mentre al settimo giorno è risultata pari a 2.1 Log UFC/ml. Le concentrazioni medie ottenute in Nutrient broth sono risultate pari a 1.5 Log UFC/ml al momento dell'inoculo e pari a 5.6 Log UFC/ml al settimo giorno (Fig.56).



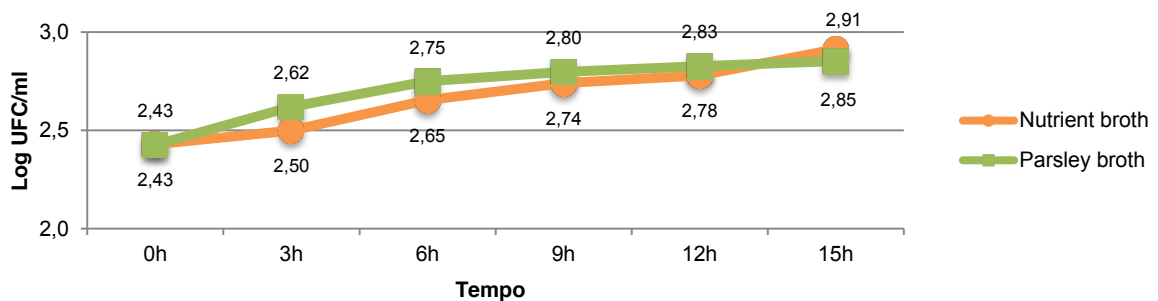
Alla temperatura di 37°C nel “*Parsley Broth*” al momento dell’inoculo, la concentrazione media di *Listeria monocytogenes* è risultata pari a 1.56 Log UFC/ml, mentre dopo 15 ore dal momento dell’inoculo è risultata pari a 9.7 Log UFC/ml. Le concentrazioni medie ottenute al momento dell’inoculo in Nutrient broth dello stesso microrganismo sono risultate pari a 1.47 Log UFC/ml, mentre dopo 15 ore i livelli medi di concentrazione media sono risultati pari a 10.48 Log UFC/ml (Fig. 57).

**Fig. 57** Curva di crescita di *Listeria monocytogenes* a 37°C



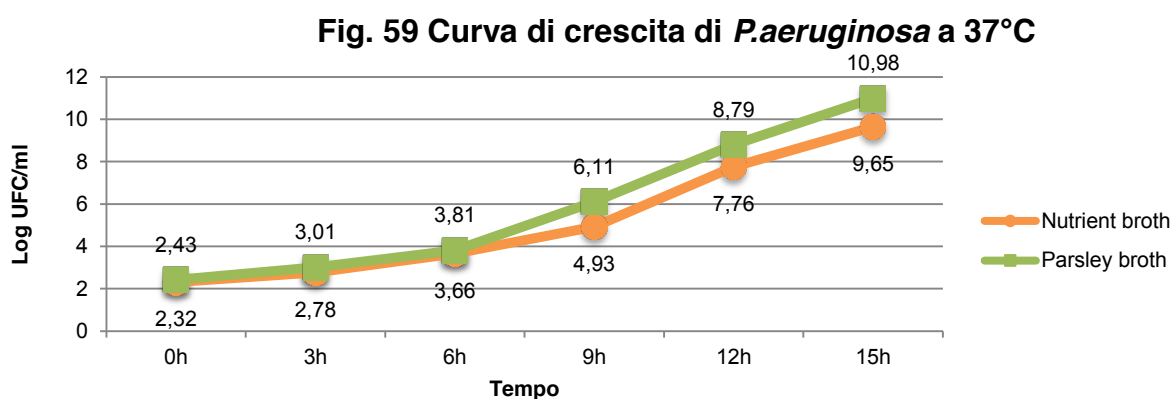
La concentrazione media di *P. aeruginosa*, nel terreno di coltura “*Parsley Broth*” alla temperatura di 4°C, al momento dell’inoculo è pari a 2.43 Log UFC/ml, mentre dopo 15 ore è risultata pari a 2.85 Log UFC/ml. Le concentrazioni medie ottenute in Nutrient broth sono risultate pari a 2.32 Log UFC/ml al momento dell’inoculo e pari a 2.91 Log UFC/ml dopo 15 ore (Fig. 58).

**Fig. 58** Curva di crescita di *P.aeruginosa* a 4°C



La concentrazione media di *P. aeruginosa*, nel terreno di coltura “Parsley Broth” alla temperatura di 37°C, al momento dell’inoculo è pari a 2.43 Log UFC/ml, mentre dopo 15 ore è risultata pari a 10.98 Log UFC/ml. Le concentrazioni medie ottenute in Nutrient broth sono risultate pari a 2.32 Log UFC/ml al momento dell’inoculo e pari a 9.65 Log UFC/ml dopo 15 ore (Fig.59).

	CMT	<i>Enterobacteriaceae</i>	Conta psicrofila	<i>Pseudomonas spp.</i>
<b>Materia Prima</b>	6.15 ± 0.07	4.30 ± 0.09	6.15 ± 0.07	4.90 ± 0.07
<b>Prodotto finito</b>	6.08 ± 0.05	4.92 ± 0.06	5.52 ± 0.08	4.11 ± 0.05



### 7.9 Processo di Lavaggio dei prodotti di IV gamma

Le variazioni delle concentrazioni microbiche medie ottenute come conseguenza del processo di lavaggio delle verdure di IV gamma (Prezzemolo) sono indicate nella Tab. 42.

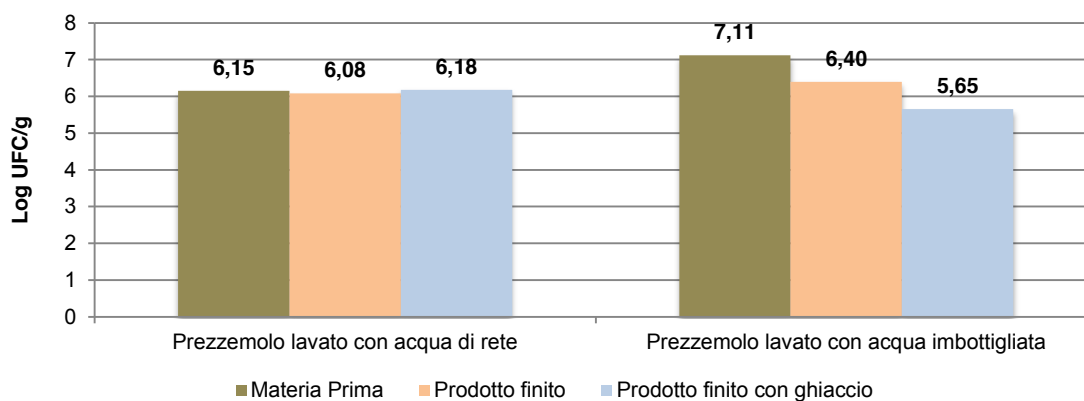
<b>Prodotto finito con ghiaccio</b>	6.18 ± 0.08	4.68 ± 0.06	6.15 ± 0.05	4.28 ± 0.06
<b>Prezzemolo lavato con acqua imbottigliata</b>				
	<b>CMT</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<b>Conta psicrofila</b>	<i>Pseudomonas spp.</i>
<b>Materia Prima</b>	7.11 ± 0.07	5.26 ± 0.06	6.74 ± 0.07	4.20 ± 0.06
<b>Prodotto finito</b>	6.40 ± 0.07	4.70 ± 0.07	5.92 ± 0.06	3.52 ± 0.06
<b>Prodotto finito con ghiaccio</b>	5.65 ± 0.07	3.92 ± 0.06	5.11 ± 0.08	3.28 ± 0.07

I risultati delle indagini analitiche sull'acqua di rete utilizzata nel corso dell'esperimento hanno mostrato valori di CMT a 22°C pari a 80 UFC/ml, valori di CMT a 36°C pari a 20 UFC/ml, mentre sono risultati al di sotto del limite di rilevabilità del metodo (<1 UFC/ml) *E. coli*, *Enterococchi*, Coliformi totali e *Pseudomonas aeruginosa*.

La concentrazione media della CMT (Fig. 60) nella materia prima "Prezzemolo" sottoposta ai processi di lavaggio con acqua di rete è pari a 6.15 Log UFC/g, conseguentemente al lavaggio con sola acqua di rete, la concentrazione media della CMT risulta pari a 6.08 Log UFC/g, mentre valori medi pari a 6.18 Log UFC/g sono risultati come conseguenza del lavaggio della materia prima con acqua di rete e ghiaccio.

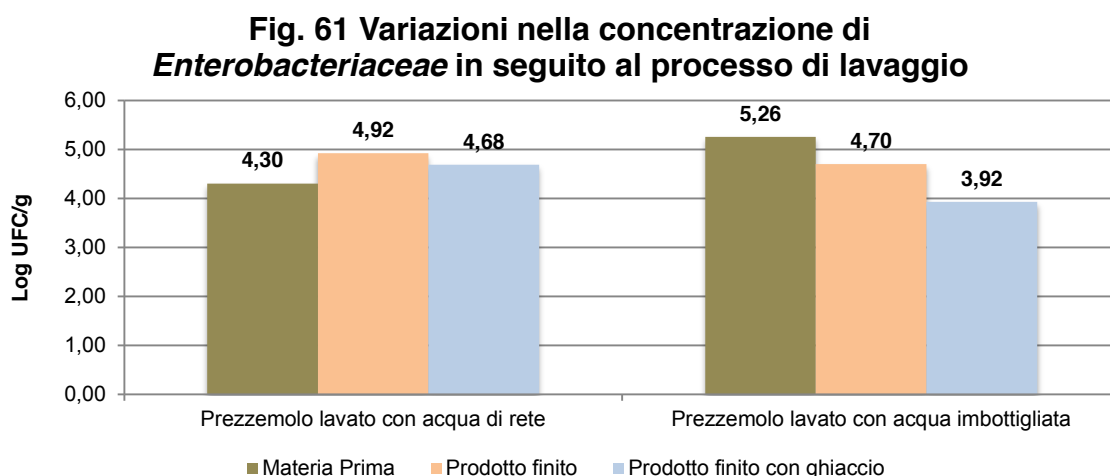
I campioni sottoposti ai processi di lavaggio con acqua imbottigliata mostrano concentrazioni di CMT, nella materia prima "Prezzemolo" pari a 7.11 Log UFC/g, conseguentemente al lavaggio con sola acqua, la concentrazione media della CMT risulta pari a 6.40 Log UFC/g, mentre valori medi pari a 5.65 Log UFC/g sono risultati come conseguenza del lavaggio della materia prima con acqua imbottigliata e ghiaccio.

**Fig. 60 Variazioni nella CMT in seguito al processo di lavaggio**



La concentrazione media delle *Enterobacteriaceae* (Fig. 61) nella materia prima “Prezzemolo” sottoposta ai processi di lavaggio con acqua di rete è pari a 4.30 Log UFC/g, conseguentemente al lavaggio con sola acqua di rete, la concentrazione media della CMT risulta pari a 4.92 Log UFC/g, mentre valori medi pari a 4.68 Log UFC/g sono risultati come conseguenza del lavaggio della materia prima con acqua di rete e ghiaccio.

I campioni sottoposti ai processi di lavaggio con acqua imbottigliata mostrano concentrazioni di *Enterobacteriaceae*, nella materia prima “Prezzemolo” pari a 5.26 Log UFC/g, conseguentemente al lavaggio con sola acqua, la concentrazione media della CMT risulta pari a 4.70 Log UFC/g, mentre valori medi pari a 3.92 Log UFC/g sono risultati come conseguenza del lavaggio della materia prima con acqua imbottigliata e ghiaccio.

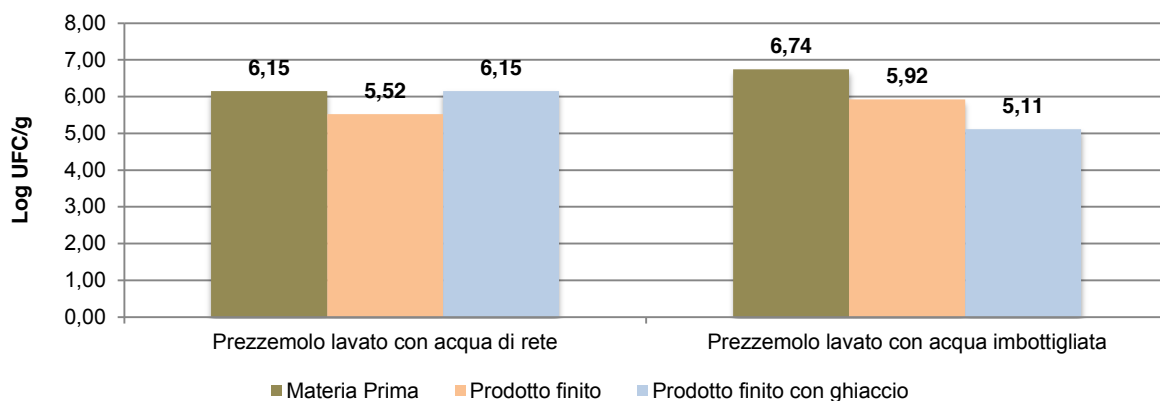


La concentrazione media della Conta psicrofila (Fig. 62) nella materia prima “Prezzemolo” sottoposta ai processi di lavaggio con acqua di rete è risultata pari a 6.15 Log UFC/g, conseguentemente al lavaggio con sola acqua di rete, la concentrazione media della CMT risulta pari a 5.52 Log UFC/g, mentre valori medi pari a 6.15 Log UFC/g sono risultati come conseguenza del lavaggio della materia prima con acqua di rete e ghiaccio.

I campioni sottoposti ai processi di lavaggio con acqua imbottigliata mostrano concentrazioni di Conta psicrofilanella materia prima “Prezzemolo” pari a 6.74 Log UFC/g, conseguentemente al lavaggio con sola acqua, la concentrazione media della CMT risulta pari a 5.92 Log UFC/g, mentre valori medi pari a 5.11 Log UFC/g sono risultati come conseguenza del lavaggio della materia prima con acqua imbottigliata e ghiaccio.



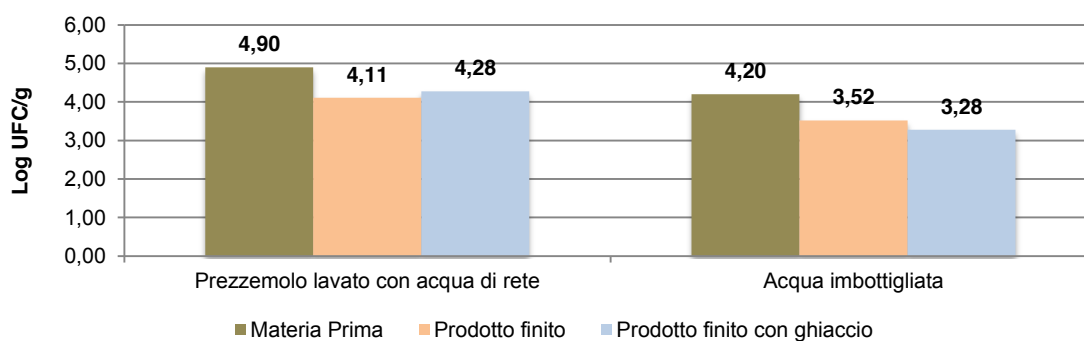
**Fig. 62 Variazioni nella Conta psicrofila in seguito al processo di lavaggio**



La concentrazione media di *Pseudomonas* spp. (Fig. 63) nella materia prima “Prezzemolo” sottoposta ai processi di lavaggio con acqua di rete è pari a 4.90 Log UFC/g, conseguentemente al lavaggio con sola acqua di rete, la concentrazione media della CMT risulta pari a 4.11 Log UFC/g, mentre valori medi pari a 4.28 Log UFC/g sono risultati come conseguenza del lavaggio della materia prima con acqua di rete e ghiaccio.

I campioni sottoposti ai processi di lavaggio con acqua imbottigliata mostrano concentrazioni di *Pseudomonas* spp., nella materia prima “Prezzemolo” pari a 4.20 Log UFC/g, conseguentemente al lavaggio con sola acqua, la concentrazione media della CMT risulta pari a 3.52 Log UFC/g, mentre valori medi pari a 3.28 Log UFC/g sono risultati come conseguenza del lavaggio della materia prima con acqua imbottigliata e ghiaccio.

**Fig. 63 Variazioni nella concentrazione di *Pseudomonas* spp. in seguito al processo di lavaggio**



La temperatura media dell'acqua misurata durante il processo di lavaggio delle verdure è, nel caso dei lavaggi effettuati solo con acqua, pari a  $5.60 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  e nel processo di lavaggio con acqua e ghiaccio, pari a  $1.62 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  (Tab. 43).

Sola acqua	$5.60 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$
Acqua e ghiaccio	$1.62 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

## CAPITOLO 8

### 8.1 Discussione e Conclusioni

I prodotti di IV gamma rappresentano una tipologia alimentare “*ready to eat*” per la quale l'aspetto igienico sanitario acquista fondamentale importanza in considerazione del fatto che il prodotto viene consumato, come indicato in etichetta, senza ulteriore lavaggio. I prodotti di origine vegetale risultano inoltre fortemente raccomandati dalle attuali linee guida per una sana ed equilibrata alimentazione con elevata frequenza di assunzione giornaliera. Principalmente da tale considerazione è emersa la necessità di condurre uno studio che potesse contribuire sia alla definizione delle caratteristiche della microflora normale dei prodotti di IV gamma, sia alla definizione della frequenza di isolamento di microrganismi patogeni ma soprattutto alla valutazione del rischio durante la loro vita conservativa in relazione alla loro presenza, attraverso l'allestimento di challenge test. Infatti se è vero che la qualità del prodotto di IV gamma attualmente può essere ottenuta attraverso un adeguato disciplinare produttivo è pur vero, che questa stessa qualità dovrebbe essere mantenuta e garantita fino al consumatore finale. Le operazioni di movimentazione nel corso della commercializzazione espongono i prodotti a condizioni di abuso termico e inoltre occorre tenere presente anche le condizioni di controllo delle temperature non sempre ottimali da un punto di vista della conservazione domestica (101).

I valori di concentrazione idrogenionica e di attività dell'acqua misurati nelle differenti tipologie di prodotto di IV gamma sono sempre risultati favorevoli per la crescita microbica nelle diverse tipologie di prodotto esaminato.

I risultati derivanti dall'applicazione delle tecniche analitiche per la determinazione delle concentrazioni dei principali parametri microbiologici (Conta mesofila totale a 30°C e psicofila, *Enterobacteriaceae*, *E.coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, Lieviti e Muffe) hanno permesso di ottenere una valutazione della qualità igienico sanitaria dei prodotti esaminati. Come riportato da altri Autori (102), la qualità di questi prodotti è risultata complessivamente accettabile ma sicuramente passibile di ulteriori miglioramenti. Infatti dai risultati analitici sulle differenti tipologie campionarie si è osservato come in relazione al Regolamento CE 2073/2005 così come modificato dal Regolamento CE 1441/2007, i criteri di sicurezza riferiti a *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* siano stati sempre rispettati tranne per un solo campione di rucola nel quale è stata isolata, sia attraverso il metodo colturale che molecolare, *Listeria monocytogenes* alla concentrazione di  $4.4 \times 10^4$

UFC/g. La caratterizzazione molecolare del profilo di virulenza del ceppo isolato ha evidenziato la presenza dei geni *prfA*, *rrn*, *actA*, *inlA*, *inlB*, *iap*, *plcA*, *plcB*.

In relazione alla valutazione del grado di protezione del prodotto da contaminazioni di origine fecale, si è potuto osservare come *Escherichia coli* sia risultato presente nel 19.3% dei campioni di vegetali di IV gamma sottoposti a indagine microbiologica, rappresentati con maggiore frequenza da “Prezzemolo tritato”, “Insalate miste” e “Rucola”. Nel 5.3% dei prodotti ha mostrato valori di contaminazione compresi tra  $10^2$  e  $10^3$  UFC/g mentre nel 7.3% ha superato valori di  $10^3$  UFC/g. Nel 6.7% i livelli di contaminazione sono risultati inferiori a  $10^2$  UFC/g.

Nonostante la tipizzazione molecolare abbia escluso la presenza di specie patogene, questi risultati suggeriscono la necessità di interventi di miglioramento attuabili attraverso una maggiore attenzione ai controlli di qualità della materia prima e dell’acqua utilizzata per l’irrigazione direttamente nei campi. (1, 103). *Yersinia enterocolitica* è stata isolata in un solo campione di “Rucola”.

In riferimento ad una valutazione globale del livello medio di contaminazione sui prodotti di IV gamma espresso dalla Conta mesofila totale a 30°C, si è osservato come il 58% dei 300 campioni esaminati abbia mostrato concentrazioni superiori a  $5 \times 10^7$  UFC/g mentre il 39.2% ha mostrato valori di Conta psicofila superiori a  $5 \times 10^7$  UFC/g (Fig. 28).

Muffe e lieviti hanno mostrato valori superiori a  $10^4$  UFC/g nel 35.3% dei campioni anche se in nessuno dei campioni esaminati è stata osservata crescita nel corso della *shelf life* del prodotto. Il 76% dei campioni ha evidenziato valori di *Enterobacteriaceae* superiori a  $10^4$  UFC/g. Le specie più frequentemente isolate sono risultate essere *Pantoeaspp* e *Enterobacter cloacae*. Tale risultato merita particolare attenzione soprattutto considerando la possibilità per tale tipologia di prodotto di inserirsi in particolari categorie di utenze come ad esempio quelle della ristorazione ospedaliera. Qualora si dovesse presentare questa possibilità emerge fortemente la necessità di contenere tale parametro entro limiti più restrittivi, risultato realizzabile attraverso l’inserimento in fase di processo di un’ulteriore fase di lavaggio per esempio in acqua ozonizzata come dimostrato da altri autori (104).

La stessa valutazione è applicabile ai risultati ottenuti dalla ricerca e conteggio di *Pseudomonadaceae* e altri bastoncelli Gram negativi che, oltre a rappresentare agenti alteranti di particolare rilievo in tali prodotti proprio a causa della loro psicofilia, possono rappresentare un rischio per la salute.

Dalla caratterizzazione microbiologica degli ambienti di lavorazione relativa ai tre differenti stabilimenti esaminati si è potuto osservare come le buone norme di prassi igienica vengano

costantemente rispettate. Il 31.7% delle superfici analizzate, destinate a venire a contatto con gli alimenti, ha mostrato valori di CMT superiori a 100 UFC/cm<sup>2</sup>, l'11.9% valori di *Enterobacteriaceae* superiori a 100 UFC/cm<sup>2</sup>. Le principali problematiche associate ai prodotti di IV gamma non sembrerebbero riconducibili a inadeguata applicazione di procedure in fase di lavorazione da parte del personale ma piuttosto a punti critici a monte e alla fine del processo.

Anche la qualità delle acque di processo è risultata sempre soddisfacente con costante assenza dei principali indicatori di contaminazione fecale (*E. coli*, *Enterococchi*).

I risultati relativi alla qualità microbiologica dell'aria negli ambienti di lavorazione esprimono livelli di contaminazione che, seppure all'interno del *range* di accettabilità, necessitano l'impostazione di attività di miglioramento (percorsi tra materie prime e prodotti trasformati separati, introduzione di filtri, utilizzo di mascherine da parte degli operatori, ecc.). Questo si osserva soprattutto nella sala confezionamento, dove le concentrazioni microbiche sono sovrapponibili a quelle della sala lavorazione alla fine del processo.

La *shelf life* di Insalate miste di IV gamma esaminate nel presente studio è risultata di oltre diecigiorni, dove la qualità del prodotto poteva ancora essere accettabile. Tuttavia l'eventuale presenza di microrganismi patogeni per l'uomo condiziona il ciclo di vita dei prodotti che necessita di essere valutato alla luce della possibilità di sopravvivenza e di crescita dei microrganismi patogeni e soprattutto di quelli in grado di potersi moltiplicare in tali tipologie di prodotti e alle condizioni di temperatura.

Pertanto lo studio di *shelf life* del prodotto associato a quello di challenge test ha permesso di valutare, per *Listeria monocytogenes*, l'evoluzione della sua dinamica di crescita nel prodotto di IV gamma in differenti condizioni di temperatura, al fine della valutazione del rischio.

Analizzando i risultati ottenuti e dal calcolo del potenziale di crescita ( $\delta$ ) si può notare come per quanto riguarda la crescita di *L.monocytogenes* nel prodotto di IV gamma questa presenti differenze nel comportamento in relazione alle differenti tipologie di prodotti esaminati.

Il "prezzemolo tritato" e le "Carote alla Julienne" hanno presentato un potenziale di crescita  $\delta < 0.5$  per *Listeria monocytogenes*. Considerando che la matrice dovrebbe risultare favorevole per la crescita in relazione ai parametri ecologici, questo risultato è stato associato alla presenza nel prezzemolo di sostanze con possibile attività inibente come le Cumarine o l'Apiolo (105, 106), e nelle carote al Falcarinolo (107). Per verificare l'eventuale effetto inibente sono stati condotti dei test che hanno previsto la determinazione della MIC in micro piastre da 96 pozzetti, a due temperature differenti per le suddette sostanze senza però osservare effetto inibente in vitro nei confronti di *L.monocytogenes*.

I risultati osservati negli alimenti nei quali non è avvenuta o è stata in qualche modo rallentata la crescita di *L.monocytogenes* sono probabilmente attribuibili a effetti sinergici tra temperatura, flora antagonista, sostanze ad attività antimicrobica.

Nelle tipologie di prodotto di IV gamma “Rucola intera e tritata” e “Insalata mista” si è potuto osservare invece che *L. monocytogenes* cresce sia pure con qualche difficoltà nella tipologia non tritata a 4°C, ma comunque presenta potenziale di crescita  $\delta >0.5$  sia a 4°C che a 8°C. In considerazione a tale rischio è possibile ipotizzare per la prima tipologia di prodotti una *shelf life* più lunga compatibile con altri criteri di qualità, anche sensoriali del prodotto e, per gli altri, in considerazione a eventuali condizioni di abuso termico, una vita conservativa di nove giorni.

Dai risultati dei *challenge test* su Rucola e Insalata mista si evince che il microrganismo è in grado di sopravvivere e a volte crescere in entrambe le situazioni di refrigerazione. Per quanto riguarda la temperatura di conservazione, i risultati hanno dimostrato che nonostante ci sia stata una crescita sia a 4°C che a 8 °C, i valori raggiunti in condizioni di abuso termico partendo dalla stessa concentrazione iniziale sono risultati più elevati ( $p < 0.05$ ).

I risultati sul prezzemolo tritato sono stati confermati eseguendo un challenge test biomolecolare attraverso la rilevazione mediante *PMAR* real time PCR del gene *ftsZ* di *Listeria monocytogenes*.

Il rischio di risultati falsi positivi determinati dall'impossibilità di discriminare tra microrganismi vivi e morti, in sede di amplificazione del DNA batterico, è stato evitato attraverso l'utilizzo di un colorante intercalante il DNA: il Propidio monoazide (PMA). Il trattamento del campione col PMA ha permesso il mascheramento in sede di amplificazione del DNA delle cellule di *Listeria monocytogenes* morte o con parete danneggiata e la rilevazione selettiva del DNA delle cellule vitali. Tale metodo può rappresentare un'alternativa al metodo colturale classico specialmente nel caso di challenge test che prevedono condizioni di particolare stress (carenza di nutrienti, temperature estreme, presenza di composti batteriostatici, presenza di flora antagonista) per il microrganismo oggetto dello studio allo scopo di valutare le capacità di sopravvivenza e l'eventuale presenza di cellule vitali ma non coltivabili (VBNC).

Il prodotto di IV gamma è sottoposto ad una tecnologia produttiva che attualmente prevede una shelf-life media non particolarmente lunga. In questo periodo di conservazione la flora psicofila e altri microrganismi patogeni come *L. monocytogenes* possono moltiplicarsi perché risultano quelli più adattati alle condizioni di confezionamento ed alle temperature di conservazione del prodotto.

Le curve di crescita in *Parsley broth* rappresentano uno strumento utile per valutare il rischio associato a *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* nel prezzemolo in assenza di fenomeni di competizione con altre specie microbiche quali appunto si possono verificare alla fine del processo produttivo (lavaggi, utilizzo di disinfettanti, ecc.). Il *Parsley broth* rappresenta, infatti, un terreno di coltura minimo, non sottoposto a trattamenti termici, con formulazione il più possibile simile alla materia prima utilizzata per la sua preparazione. La capacità di *Listeria monocytogenes* di sopravvivere nella matrice “Prezzemolo” alla temperatura di 4°C è stata ulteriormente confermata attraverso l’allestimento delle curve di crescita.

Alla temperatura di 37°C, si evidenzia la capacità di *L. monocytogenes* di crescere nel brodo prezzemolo con un comportamento sovrapponibile a quello manifestato in un terreno di coltura più ricco in nutrienti come il Nutrient broth.

Questo risultato potrebbe confermare l’effetto sinergico osservato nell’alimento nel corso dei *challenge test*.

L’allestimento delle curve di crescita ha permesso di valutare inoltre il comportamento di *Pseudomonas aeruginosa* in una matrice alimentare come il prezzemolo, caratterizzata spesso da elevate concentrazioni microbiche di *Pseudomonadaceae* (valori medi pari a 3.72 Log UFC/g). Nel caso di *P. aeruginosa*, l’allestimento di *challenge test* classici nei prodotti vegetali di IV gamma è spesso difficoltoso a causa di una sovra crescita batterica che determina un mascheramento delle colonie tipiche in sede di valutazione colturale. Attraverso le curve di crescita in *Parsley broth* è stata confermata la capacità di *P. aeruginosa* di moltiplicarsi a entrambe le temperature considerate.

I risultati ottenuti relativamente all’abbattimento delle concentrazioni microbiche nei prodotti vegetali evidenziano come la buona riuscita del processo di lavaggio sia strettamente correlata alla concentrazione microbica della materia prima utilizzata durante il processo produttivo. Il processo di lavaggio dei prodotti vegetali pur essendo mirato all’eliminazione delle impurità e corpi estranei dalla superficie del prodotto, può in alcuni casi favorire l’internalizzazione dei microrganismi attraverso gli stomi e le ferite e talvolta può risultare non efficace nel processo di rimozione di *biofilm* batterici (108, 109, 110). La qualità dell’acqua utilizzata per il processo di lavaggio necessiterebbe di standardizzazione su parametri sovrapponibili a quelli di un’acqua imbottigliata affinché l’abbattimento delle concentrazioni microbiche risulti significativo.

Per poter garantire l’immissione sul mercato di un prodotto che abbia ottime caratteristiche sarà necessario che:

- Il produttore utilizzi materie prime di ottima qualità microbiologica come riportato in recenti studi (1),
- Si rispettino le misure di igiene di lavorazione del prodotto (GMP),
- Si conservi il prodotto alla temperatura di refrigerazione prossima ai 4°C, sia durante la produzione che durante il trasporto, commercializzazione e conservazione domestica.
- Per i vegetali di IV gamma si stabilisca una vita commerciale differente in relazione alla tipologia di prodotto,
- Si utilizzi acqua di irrigazione per il prodotto di I gamma che risponda a requisiti qualitativi (1).

In conclusione si può evidenziare la grande importanza dei Challenge test. Essi sono studi in grado di produrre un ampio numero di informazioni oltre ad essere molto affidabili perché si basano su dati riguardanti proprio l'alimento studiato che rappresenta un sistema vitale dinamico e dotato di unicità. Sono in grado di considerare la variabilità dei prodotti alimentari, la contaminazione tipica dell'alimento, anche se il livello di contaminazione, l'eterogeneità della contaminazione e lo stato fisiologico delle cellule batteriche sono difficili da imitare.



## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Coroneo V., Dessì S., Carraro V., Brandas V., Sanna C., Sanna A. Qualità microbiologica del processo di produzione dei vegetali di I Gamma (Lattuga). *Industrie Alimentari*, Anno 53, n°542, p.5-10, gennaio 2014.
2. Murphy M.M., Stettler N., Smith K.M., Reiss R. Associations of consumption of fruits and vegetables during pregnancy with infant birth weight or small for gestational age births: a systematic review of the literature. *International Journal of Womens Health*. 2014 Oct 20;6:899-912.
3. Soliman A., De Sanctis V., Elalaily R. Nutrition and pubertal development. *Indian Journal of Endocrinol Metab*. 2014 Nov;18:S39-47.
4. Rui Hai Liu. Health-Promoting Components of Fruits and Vegetables in the Diet. *Advances in Nutrition* May 2013 vol. 4: 384S-392S, 2013.
5. [http://www.cavallarozucche.altervista.org/pdf/02\\_pp\\_1\\_24.pdf](http://www.cavallarozucche.altervista.org/pdf/02_pp_1_24.pdf)
6. <http://www.ilpuntocoldiretti.it/attualita/Pagine/Consumi,nel2014crollanogliortaggi diIVgamma.aspx>
7. <http://www.ismeaservizi.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/4754>
8. [http://www.istat.it/it/files/2013/03/bes\\_2013.pdf](http://www.istat.it/it/files/2013/03/bes_2013.pdf)
9. <http://www.nomisma.it/index.php/it/Nomisma-Tendenze-IVGamma Pantini Zucconi-Cibus-Tec-2014.pdf>
10. [www.eufic.org](http://www.eufic.org)
11. Sanna A., Coroneo V., Fadda D., Dessì S. Aspetti microbiologici di prodotti orticoli di IV gamma. *Industrie alimentari- XLIII*, 995-999 (2004)
12. F. Pimpini - M. Giannini - R. Lazzarin *Ortaggi da foglia da taglio*. Veneto Agricoltura, Sezione Ricerca e Sperimentazione,
13. Regolamento (CE) n. 1543/2001 della Commissione, del 27 luglio 2001, che stabilisce la norma di commercializzazione applicabile alle lattughe, alle indivie ricce e alle scarole.
14. Colelli, G., Elia, A., 2009. I prodotti ortofruttili di IV gamma: aspetti fisiologici e tecnologici. *Italus Hortus* 1, 55-78.
15. LEGGE 13 maggio 2011, n. 77 “Disposizioni concernenti la preparazione, il confezionamento e la distribuzione dei prodotti ortofruttili di quarta gamma.”
16. UNI 11350:2010 “Prodotti ortofruttili freschi pronti per il consumo (IV Gamma)– Definizione, requisiti e principi generali.

17. REGOLAMENTO (CE) 852/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO sull'igiene dei prodotti alimentari.
18. Gli ortaggi di IV gamma- innovazioni nella coltivazione e nella lavorazione. Regione Sicilia, Assessorato all'industria.
19. De Stefano L., Caponigro V. Rischio microbiologico e contenimento della microflora. Giornata di studio sulla protezione delle colture da foglia per quarta gamma "Protezione delle colture da foglia per la IV Gamma" Battipaglia, 30 aprile 2013.
20. Gomes, C., Moreira, R. G., & Castel-Perez, E. (2011). Radiosensitization of *Salmonella* spp. And *Listeria* spp. In ready-to-eat baby spinach leaves. *Journal of Food Science*, 76(1), 141e148.
21. Hrudey, S. E. (2009). Chlorination disinfection by-products, public health risk tradeoffs and me. *Water Research*, 43, 2057e2092. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.02.011>.
22. Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Harris, L. J., Garrett, E. H., Farber, J. N., et al. (2003). Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(Suppl.), 161e173.
23. Food and drug administration secondary direct food additives permitted in food for human consumption federal register. Rules and regulations, Vol. 66 June 26, 2001. Number 123, pp.33829e33830.
24. World Health Organization. (2008). Microbiological risk assessment series In *Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables*.
25. [www.fao.org/ag/AGN/agns/files/FFV\\_2007](http://www.fao.org/ag/AGN/agns/files/FFV_2007).
26. Khadre, M. A., Yousef, A. E., & Kim, J.eG. (2001). Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *Journal of Food Science*, 66, 1242e1252.
27. Zhang, S., & Faber, J. M. (1996). The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiology*, 13, 311e321.
28. Ölmez, H. (2010). Effect of different sanitizing methods and incubation time and temperature on inactivation of *Escherichia coli* on lettuce. *Journal of Food Safety*, 30, 288e299. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4565.2009.00206.x>.
29. World Health Organization. (2008). Microbiological risk assessment series In *Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables*.

30. Food and Drug Administration (FDA). (1999 May). U.S. regulatory requirements for irradiating foods.
31. <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/IrradiatedFoodPackaging/ucm110730.htm>.
32. Junquiera-Gonçalves, M. P., Galotto, M. J., Valenzuela, X., Dinten, C. M., Aguirre, P., & Miltz, J. (2010). Perception and view of consumers on food irradiation and the Radura symbol. *Radiation Physics and Chemistry*, 80, 119e122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2010.08.001>.
33. Batterman, S., Zhang, L., & Wang, S. (2000). Quenching of chlorination disinfection by-product formation in drinking water by hydrogen peroxide. *Water Research*, 34, 1652e1658.
34. Gopal, A., Coventry, J., Wan, J., Roginski, H., & Ajlouni, S. (2010). Alternative disinfection techniques to extend the *shelf life* of minimally processed iceberg lettuce. *Food Microbiology*, 27, 210e219.
35. World Health Organization. (2003c). Silver in drinking-water. Guidelines for drinking-water quality (2nd ed.). In *Health criteria and other supporting information*, Vol. 2
36. Issa-Zacharia, A., Kamitano, Y., Muhimbula, H. S., & Ndabikunze, B. K. (2010 Dec). A review of microbiological safety of fruits and vegetables and the introduction of electrolysed water as an alternative to sodium hypochlorite solution. *African Journal of Food Science*, 4 (13), 778e789.
37. Gil, M. I., Selma, M. V., López-Galvez, F., & Allende, A. (2009). Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 37e45.
38. Ministero della Salute - RELAZIONE SUL SISTEMA DI ALLERTA EUROPEO, anno 2014
39. Cedric N. Berger, Samir V. Sodha, Robert K. Shaw, Patricia M. Griffin, David Pink, Paul Hand and Gad Franke. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology* (2010) 12(9), 2385–2397
40. Kakiomenou K., Tassou C., and Nychas G.-J. Survival of *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on salad vegetables. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol 14, 1998, 383±387

41. Cordano A. M., Jacquet C. *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: Prevalence and strain characterization. *International Journal of Food Microbiology* 132 (2009) 176–179
42. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013 European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control
43. V. Coroneo *Tossinfezioni alimentari* Cap. 13. *ADDITIVI E TOSSICI NEGLI ALIMENTI* Marinella Melis Autori: A. Angioni, A. Barra, P. Cattaneo, G. Comi, V. Coroneo, M. Melis, G. Scortichini. Libreria universitaria.it edizioni
44. 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
45. JM Jay, Martin J. L., David A. Golden. *Microbiologia degli alimenti* -2009- Springer.
46. Liguori G. *Origine della contaminazione e fattori di crescita dei microrganismi negli alimenti*. Università degli Studi di Napoli “Federico II” Napoli 20 e 27 Novembre 2009.
47. Likotrafiti E., Smirniotis P, Nastou A., Rhoades J. Effect of relative humidity and storage temperature on the behavior of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables. *Journal of Food Safety* November 2013 Vol.33 (4), 545-551
48. Berger C.N., S.V. Sodha, R.K.Shawn, P.M. Griffin, D. Pink, P.Hand, G. Frankel- Fresh fruit and vegetables as veichles for the transmission of human pathogens. *Enviromental Microbiology* (2010) 12(9), 2385-2397.
49. Zavanella M. *I microrganismi, i vegetali e l'uomo*. Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche Brescia. Vol 96-2014
50. Littlea C.L., Taylorb F.C., Sagooa S.K., Gillespiea I.A., Granta K., McLauchlina J. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail pre-packaged mixed vegetable salads in the UK. *Food Microbiology* 24 (2007) 711–717
51. Kramer, Cantoni. “Alimenti, microbiologia e igiene”. *Tecniche Nuove*. (2011).
52. Checacci *Igiene generale*
53. *Foodborne disease outbreaks: Guidelines for investigation and control-* World healt organization.

54. Su, L.H., and Chiu, C.H. Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J* 30 (2007): 210–219
55. Wariner K.; Spaniolas S.; Dickinson N.; Wright C. & Wolters W.M. Internalization of bioluminescent *Escherichia coli* and *Salmonella* Montevideo in growing bean sprouts. *J. Appl. Microbiol.* 95, (2003), 719-722.
56. Berger C.N.; Sodha S.V.; Shaw R.K.; Griffin P.M.; Pink D.; Hand P. & Frankel G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental microbiology* 12, (2010), 2385-2397.
57. M. Zavanella. I microrganismi, i vegetali e l'uomo. Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche Brescia. Vol 96-2014
58. Lamont R.F., Sobel J., Mazaki-Tovi S., Kusanovic J.P., Vaisbuch E., Kim S.K., Uldbjerg N. and Romero R. Listeriosis in human pregnancy: a systematic review *J. Perinat. Med.* 39 (2011) 227–236
59. Caprioli A., Epidemiologia delle infezioni da *E. coli* produttori di verocitotossina (VTeC) in Italia. Attività del Laboratorio. Sanità Pubblica: scenari di sinergie medico- veterinarie. Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza alimentare, istituto Superiore di Sanità, Roma, 8 novembre 2008.
60. Chart H. e Coll., Human infections with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 - 10 years of *E. coli* O157 serodiagnosis, *J. Med. Microbiol.* 2008, 57, 1389-1393
61. Meloni D., Mazza R., Piras F., Lamon S., Consolati S.G., Mureddu A., Mazzette R. The biofilm formation ability of *Listeria monocytogenes* isolated from meat, poultry, fish and processing plant environments is related to serotype and pathogenic profile of the strains. *Veterinary Science Development* 2012, vol 2:e12
62. Kramer J., Cantoni C., *Alimenti, Microbiologia e Igiene*, Milano, Organizzazione Editoriale Medico Farmaceutica, 1990
63. Schuppler M, Loessner MJ. The Opportunistic Pathogen *Listeria monocytogenes*: Pathogenicity and Interaction with the Mucosal Immune System. *International Journal of Inflammation*, 2010. *Int J Inflamm.* 2010. 2010:704321
64. De las Heras A, Cain RJ, Bielecka MK, Vázquez-Boland JA. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Curr Opin Microbiol.*, 2011. 14:118-27

65. Seveau S, Pizarro-Cerda J, Cossart P. Molecular mechanisms exploited by *Listeria monocytogenes* during host cell invasion. *Microbes and Infection*, 2007. 9(10):1167-75
66. Vazquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J., and Kreft J. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants *Clinical Microbiology Reviews*, July 2001, p. 584–640
67. REGOLAMENTO (CE) N. 1441/2007 DELLA COMMISSIONE che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
68. Giaccone V., (2008) “Buone pratiche di igiene: la valutazione della shelf-life microbiologica degli alimenti”, atti convegno 15.05.08, San Donà di Piave (VE).
69. Porretta S., (2008) *Shelf Life* degli alimenti, meccanismi di valutazione e previsione, Chiriotti editori, Pinerolo.(16-21,31-34,64-65,68-69,121,203-204)
70. Tiecco Gianfranco, *Igiene e Tecnologia Alimentare*, Bologna, Calderini Edagricole, 1999
71. Katherine M. J. Swanson, Ph.D. L. *Monocytogenes* Challenge Study “how to” guidelines. *Food Safety Magazine*, June/July 2005.
72. Fontana M., Bisotti S., Ariotti R., 2007. “Il Regolamento 2073 CE e la valutazione dei criteri di processo e di sicurezza alimentare attraverso il Challenge test”. *Il progresso Veterinario* 8, 343-347
73. Uyttendaele M., Rajkovic A., Benos G., Francois K., Devlieghere F., Debevere J. Evaluation of a challenge testing protocol to assess the stability of ready-to-eat cooked meat products against growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 90 (2004) 219– 236
74. Beaufort A., The determination of ready-to-eat foods into *Listeria monocytogenes* growth and no growth categories by *challenge test*. *Food Control*, Volume 22, Issue 9, September 2011, Pages 1498-1502
75. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición .Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for FoodSafety and Nutrition (AESAN) in relation to shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in certain food products . AESAN Scientific Committee Journal N° 14. AESAN-2011-003 Report approved by the Scientific Committee on plenary session May 18th, 2011.

76. A. Scialpi, A. Mengoni La PCR e le sue varianti. Quaderno di laboratorio. Firenze University Press 2008
77. Markoulatos P., Siafakas N. and Moncany M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J. Clin. Lab. Anal.* 16:47-51.
78. Conter M., Di Ciccio P., Zanardi E., D'Orio V., Ghidini S., Vergara A., Ianieri A.. Genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from foods and food environments. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma.* VolXXVII. 157-164
79. El-Rami E., Rahal E. A., Sleiman F. T., Abdelnoor A. M. Identification of Virulence Genes among Antibacterial-Resistant *E. coli* Isolated from Poultry” – *Advanced Studies in Biology*, Vol. 4, 2012, no.8, 385-396
80. Yadav M. M., Roy A., Bhandari B. and Joshi C. Pheno-genotypic characterization of *L. monocytogenes* from bovine clinical mastitis. *Buffalo bulletin* (March2010) vol. 29 No. 1
81. N. Dreux<sup>1</sup>, C. Albagnac, M. Federighi, F. Carlin, C.E. Morris and C. Nguyenthe. Viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* on parsley leaves and absence of recovery to a culturable state. *Journal of Applied Microbiology* 103 (2007) 1272–1281
82. Klein P.G. and Juneja V.K. (1997). Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4441-4448.
83. McKillip J.L., Jaykus L.A. and Drake M. (1999). Nucleic acid persistence in heat-killed *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated skim milk. *J. Food Prot.* 62:839-844.
84. Norton D.M. and Batt C.A. (1999). Detection of viable *Listeria monocytogenes* with a 5' nuclease PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2122-2127.
85. Master C.I., Shallcross J.A. and Mackey B.M. Effects of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Appl. Bacteriol.* (1994) 77:73-79.
86. Guida sulle buone pratiche igieniche” adottata dalla Direzione Generale per la Concorrenza e la Repressione delle Frodi (DGCCFR 1993) Francia.
87. Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31"Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualita' delle acque destinate al consumo umano"

88. Guidelines for Controlling *Listeria monocytogenes* in Small- to Medium-Scale Packing and Fresh-Cut Operations. University Of California Division of Agriculture and Natural Resources.
89. Dossier n. 17 Regione Emilia Romagna/SEDI, “Metodi analitici per lo studio delle matrici alimentari”. 1993
90. Gasanov U., Hughes D., P.M. Hansbro. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *EMS Microbiology Reviews* 29 (2005) 851–875
91. Zunabovic M., Domig K.J., W. Kneifel. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments. A review. *LWT - Food Science and Technology* 44 (2011) 351e362
92. Wernars K., Heuvelman K., Notermans S., Domann E., Leimeister-Wachter M., Chakraborty T. “Suitability of the *prfA* gene, which encodes a regulator of virulence genes in *L. monocytogenes*, in the identification of pathogenic *Listeria* spp.” *Applied and environmental microbiology*, feb.1992, Vol. 58, no.2, 765-768
93. Jofré A., Martín B., Garriga M., Hugas M., Pla M., Rodríguez-López D., Aymerich T. “Simultaneous detection of *L. monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham.” *Food microbiology*, 2005, Vol. 22, 109-115
94. Conte M., Di Ciccio P., Zanardi E., Ghidini S., Vergara A., Ianieri A. “Genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from foods and food environments” *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma*. Vol XXVII 157-164
95. Beaufort A., Cornu M., Bergis H., Lardeux A.L. Documento tecnico di orientamento per gli studi sulla vita commerciale degli alimenti pronti al consumo inerenti alla *Listeria monocytogenes* AFSSA. Novembre 2008
96. L. Skalina, V.Nikolajeva Growth potential of *Listeria monocytogenes* strains in mixed ready-to-eat salads. *International Journal of Food Microbiology* 144 (2010) 317–321
97. Sant'Ana A.S., Barbosa M.S., Destro M.T, Landgraf M., Franco B. Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International Journal of Food Microbiology* 157 (2012) 52–58



98. Rico D., Martin-Diana A.B., Bara J.M. and Barry-Ryan C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review *Trends in Food Science & Technology* 18 (2007) 373- 386
99. Wang H., Feng H., Luo Y. Microbial reduction and storage quality of fresh-cut cilantro washed with acidic electrolyzed water and aqueous ozone. *Food Research International* 37 (2004) 949–956
100. Luo Y., Wachtel M. R., McEvoy J. L., Kim J., Hung Y. Package atmosphere affects postharvest biology and quality of fresh-cut cilantro leaves. *HortScience*, 39, (2004) 567–570.
101. Castro-Rosas J., F. Cerna-Cortés J. Méndez-Reyes E., et al. Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *International Journal of Food Microbiology* 156 (2012) 176–180.
102. Alexopoulos A., Plessas S., Ceciu S., Lazar V., Mantzourani I., Voidarou C., Stavropoulou E., Bezirtzoglou E. Evaluation of ozone efficacy on the reduction of microbial population of fresh cut lettuce (*Lactuca sativa*) and green bell pepper (*Capsicum annuum*). *Food Control* 30 (2013) 491-496
103. V. Coroneo, A. Sanna, F. Danjou, P. Caboni S. Dessì. Influence of season on microbiological loads in ready-to-eat vegetables *Italian Journal of Food Science*, 22, (2010) 205-209
104. Sanna A., Carraro V., Sanna C, Cabiddu C., Brandas V., Coroneo V. Evaluation of the level of domestic hygiene in household kitchens. *Annali di Igiene*, 2014 (26) p.473
105. Likotrafit E., Smirniotis P., Nastou A., Rhoades J. Effect of relative humidity and storage temperature on the behavior of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables. *Journal of Food Safety* 33 (2013) 545–551
106. Khalida Kareem Al-Kareemi Inhibitory Effect of Parsley (*Petroselinum Crispum*) Juice Against Some Urinary Pathogens in Vitro. *The Iraqi Postgraduate Medical Journal* Vol.11, No.3, 2012
107. Ljubiša S.C., Ivana C.S., Bojana B.M., Aleksandra M.C., Marijana S.B., Dragana P.V. Antimicrobial activity of plant extracts from Serbia UDC 632.3 :582 (497.11)

108. Christensen L.P., Brandt K. Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (2006) 683–693
109. De Stefano L., Caponigro V. Rischio microbiologico e contenimento della microflora. CRA-ORT (2013) Pontecagnano (SA)
110. Sapers G. M. Efficacy of Washing and Sanitizing Methods, *Food Technol. Biotechnol.* (2001)39 (4) 305–311

### **NORME DI RIFERIMENTO**

- UNI EN ISO 6887:2013 Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Preparazione dei campioni di prova, sospensione iniziale e diluizioni decimali per l’analisi microbiologica
- ISO 21527-1:2008 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds Colony count technique in products with water activity greater than 0,95
- UNI EN ISO 10273:2005 Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Metodo orizzontale per la ricerca *Yersinia enterocolitica* patogena presunta
- UNI EN ISO 17410:2001 Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Metodo orizzontale per la conta di microrganismi psicrofili
- UNI EN ISO 4833-1:2013 Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part1: Colony count a 30°C by the pour plate technique.
- UNI EN ISO 11290-1:2005 Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Listeria monocytogenes* - Parte 2:Metodo per la conta
- UNI EN ISO 11290-2:2005 Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Listeria monocytogenes* - Parte 1: Metodo per la ricerca
- UNI EN ISO 6579:2008 Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Metodo orizzontale per la ricerca di *Salmonella* spp.
- UNI EN ISO 16649-2:2010 Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Metodo orizzontale per la conta di *E. coli* beta glucoronidasi-positiva-Parte 2: Tecnica della conta delle colonie a 44°C che utilizza 5-bromo-4-cloro-3indolil beta-D-glucoronide.

- ISO 21528-2:2004 Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di Enterobacteriaceae-Parte 2: Metodo per la conta
- UNI EN ISO 7899-2:2003 Qualità dell'acqua. Ricerca ed enumerazione di *Enterococchi* intestinali Metodo di filtrazione su membrana
- UNI EN ISO 9308-1:2002 Qualità dell'acqua. Ricerca ed enumerazione di *Escherichia coli* e batteri coliformi. Metodo di filtrazione su membrana
- UNI EN ISO 7899-2:2008 Qualità dell'acqua. Ricerca e conta di *Pseudomonas aeruginosa*. Metodo di filtrazione su membrana
- ISO 18593:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surface using contact plates and swabs.