

# SOMMARIO

RIASSUNTO	3
PAROLE CHIAVE	3
1. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	4
1.1. Origine del nome	4
1.2. Classificazione e caratteristiche del genere <i>Listeria</i>	5
1.3. Biocenosi	5
1.4. Epidemiologia	6
1.5. Sintomi	6
1.6. Diagnosi	6
1.7. Metodi di analisi di riferimento	7
1.8. Prevenzione, controllo, terapia	7
1.9. Frequenza	8
2. FRUTTA	9
2.1. Prodotti di IV gamma	9
2.2. Modalità di preparazione della frutta	9
2.3. I moderni sistemi di confezionamento della frutta di IV gamma	11
2.4. Metodi di conservazione dei prodotti di IV gamma	12
2.5. I vantaggi del “MAP”	13
2.6. Gas utilizzati per il “MAP”	14
3. Regolamento (CE) n. 2073 del 15 novembre 2005	15
4. SCOPO DELLA TESI	17
5. MATERIALI E METODI	18
5.1. Matrici alimentari	18
5.2. Allestimento dell'inoculo	19
5.3. Contaminazione della frutta	20
5.4. Prelievo e modalità di campionamento	21
5.5. Schema delle analisi	22
5.5.1. Determinazione quantitativa di <i>Listeria monocytogenes</i>	22
5.5.2. Determinazione quantitativa Carica Mesofila Totale	26
5.5.3. Determinazione quantitativa Carica Psicrotrofa Totale	27
5.5.4. Determinazione quantitativa batteri lattici	28
5.5.5. Determinazione lieviti	29
5.5.6. Determinazione acqua libera	30
5.5.7. Determinazione del pH	30
6. RISULTATI	31
6.1. Contaminazione con un inoculo <10 UFC/g	31
6.2. Contaminazione con un inoculo 10 UFC/g	33
6.3. Andamento della carica batterica totale	35
6.3.1. Andamento di carica mesofila totale	35
6.3.2. Andamento dei batteri lattici	36
6.3.3. Andamento dei lieviti	37
6.3.4. Andamento del pH in frutta contaminata con quantità inferiore a 10 UFC/g	39
6.3.5. Andamento del pH in frutta contaminata con quantità di 10 UFC/g	40
7. CONSIDERAZIONI	42
8. CONCLUSIONI	43
9. BIBLIOGRAFIA	44

## RIASSUNTO

I prodotti ortofrutticoli freschi pronti al consumo (IV gamma) negli ultimi anni presentano un *trend* positivo determinato da caratteristiche di qualità di innovazione e di servizio. Essi hanno una vita commerciale limitata di 6 giorni (alimenti deteriorabili). Questi alimenti pronti al consumo (*ready to eat*), tramite la determinazione del pH e dell'attività dell'acqua, sono definiti favorevoli alla crescita di *Listeria monocytogenes*, patogeno molto diffuso nell'ambiente e nelle feci degli organismi viventi (uomo e animali). Possiede delle caratteristiche di resistenza alla disidratazione, agli agenti fisici e ambientali, alla refrigerazione, contribuendo alla sua ampia diffusione.

Il Reg. (CE) n. 2073/05 fissa per i “*Ready to Eat*” il criterio di sicurezza alimentare ponendo il limite di 100 UFC/g di prodotto. Il rispetto di tale criterio deve essere dimostrato dal produttore, con soddisfazione dell'autorità competente, fino alla data di scadenza del prodotto. In caso contrario la normativa decreta un limite molto più restrittivo, pari all'assenza in 25 g di prodotto se l'operatore non è in grado di dimostrare, effettuando studi e/o prove, che il suo prodotto non supera il limite di 100 UFC/g durante la sua *shelf life*.

Questa tesi ha studiato la dinamica di *L. monocytogenes*, artificialmente introdotta, di sopravvivere e/o svilupparsi in vaschette con frutta (melone e cocco) di IV gamma conservate alle temperature di 4°C e in condizioni di abuso termico (8°C e 12°C) per l'intera durata della *shelf-life* commerciale (6 giorni) analizzando il prodotto quotidianamente.

E' stata, inoltre valutata la carica microbica totale, i batteri lattici e i lieviti al primo giorno, al terzo e al sesto della loro vita commerciale. per ottenere una panoramica generale sulla situazione microbiologica della frutta considerata.

La sperimentazione è stata condotta su 6 lotti diversi sia di melone che di cocco.

I risultati hanno messo in evidenza che il limite di *L. monocytogenes* di 100 UFC/g di prodotto viene superato nelle condizioni di 8°C e 12°C

## PAROLE CHIAVE

*Listeria monocytogenes* - frutti di IV gamma – Regolamento (CE) n.2073/2005.

## 1.

## **LISTERIA MONOCYTOGENES**

Un tempo si riteneva che *Listeria monocytogenes* non fosse patogena né per gli animali né per l'uomo, nel 1926, attraverso la documentazione scientifica di Murray e coll., si dimostrò essere agente di processi infettivi del coniglio e del criceto (leucocitosi mononucleare e conseguente decesso). Da quel momento la patogenicità di *Listeria monocytogenes* per gli animali è stata più volte dimostrata e a partire dagli anni '40 si cominciò a sospettare che potesse essere all'origine di patologie anche nell'uomo.

Nel 1949 venne documentato in Germania il primo caso di listeriosi epidemica che portò a 85 decessi tra feti abortiti e neonati subito deceduti; il quadro clinico fu quello di una *granulomatosis infantiseptica*. La prima segnalazione certa di listeriosi alimentare risale al 1983: Schlech e coll. descrissero un caso epidemico provocato dal consumo di crauti acidi fermentati in Canada. Sempre nello stesso anno, in Francia, Rocourt distinse *L. monocytogenes* da altre listerie, intuendo che è l'unica patogena per l'uomo. In seguito, il patogeno è stato riconosciuto dalle autorità sanitarie mondiali tra le più importanti cause di malattia alimentare dell'uomo nell'occidente industrializzato.

### **1.1.Origine del nome**

Il genere *Listeria* deriva dal nome del chirurgo inglese Joseph Lister (5 aprile 1827 - 10 febbraio 1912) professore di chirurgia a Glasgow, inventore e propugnatore del metodo dell'antisepsi, che ha rivoluzionato l'atteggiamento e l'approccio dei chirurghi alla pratica operatoria. Il nome del batterio è stato dedicato a Lister da Fine, nel 1940.

La specie "*monocytogenes*" deriva da monocitosi, per il notevole aumento del numero dei monociti circolanti che l'agente eziologico induce nell'uomo e in alcune specie animali. A certe forme di listeriosi è associata una mononucleosi relativa, che arriva fino al 75% di monociti nella formula leucocitaria, il cui significato rimane incerto.

## 1.2. Classificazione e caratteristiche del genere *Listeria*

Appartiene ai batteri Gram positivi (Firmicutes), in particolare alla classe dei Bacilli. Nell'ordine delle Bacillales, si trova nella famiglia delle Listeriaceae (tabella 1)

Vi sono cinque specie all'interno

del genere *Listeria*:

- *L. innocua*,
- *L. ivanovii*,
- *L. monocytogenes*,
- *L. seeligeri*,
- *L. welshimeri*.

<b>Regno</b>	<b>Bacteria</b>
<b>Phylum</b>	<b>Firmicutes</b>
<b>Classe</b>	<b>Bacilli</b>
<b>Ordine</b>	<b>Bacillaceae</b>
<b>Famiglia</b>	<b>Listeriaceae</b>
<b>Genere</b>	<b><i>Listeria</i></b>
<b>specie</b>	<b><i>monocytogenes</i></b>

Tabella 1: classificazione *Listeria*

La caratterizzazione di *Listeria monocytogenes* si basa su aspetti fenotipici, immunologici e biomolecolari. Vengono distinti diversi sierotipi, identificati sulla base di 5 antigeni flagellari termolabili (identificati da lettere da a fino ad e) e 14 antigeni somatici termostabili (identificati da un numero da I a XIV) contenenti carboidrati. Sono noti differenti sierotipi di *L. monocytogenes* che possono causare malattia, ma il 95% degli isolati umani appartiene ai tre sierotipi: 1/2 a (44%), 1/2b (20%) e 4b (32%) (Gianfranceschi A. et al, 2007).

All'interno del genere *Listeria*, solo *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* sono considerate patogene. La prima può causare malattia sia negli animali che nell'uomo, mentre *L. ivanovii* è patogena solamente per gli animali.

## 1.3. Biocenosi

*Listeria monocytogenes* è un batterio in grado di causare una malattia a trasmissione alimentare denominata Listeriosi. *Listeria* è un germe ubiquitario, capace di resistere e moltiplicare in condizioni considerate avverse per altri batteri: infatti, sopravvive al congelamento e

all'essiccamento, può moltiplicare a temperature di refrigerazione (4°C), a valori di pH acido (4,4) e basico (9,6) e alla presenza di sale da cucina (NaCl 10-12%). La temperatura ideale per la crescita oscilla tra 0 e 45°C mentre a 50°C il batterio è inattivato.

#### 1.4. Epidemiologia

*Listeria monocytogenes* è ampiamente diffusa nell'ambiente ed è stata isolata da diverse fonti quali suolo, vegetali, foraggi insilati, materiale fecale e acque superficiali reflue. La malattia viene trasmessa tramite l'ingestione di cibo contaminato e nelle donne gravide, per passaggio attraverso la placenta dalla madre al figlio. La porta di entrata più frequente per il batterio è rappresentata dalla via orale e gli alimenti più frequentemente causa di Listeriosi sono: latte fresco non pastorizzato e derivati, formaggi, wurstel, carni lavorate (pollo); prodotti ittici, vegetali crudi, insaccati. Sebbene i piatti lavorati e pronti per il consumo siano più a rischio, è bene ricordare che il patogeno può contaminare qualsiasi alimento in qualunque fase della filiera (Rondanelli *et al.*, 2005).

#### 1.5. Sintomi

La Listeriosi può colpire l'uomo e gli animali. Nell'uomo si possono avere infezioni:

- Durante la gravidanza: le donne colpite manifestano sintomi come febbre, mal di testa, dolori muscolari, diarrea o costipazione, parto prematuro, aborto e infiammazione delle meningi.
- Nel periodo neonatale: in questo caso *Listeria monocytogenes* raggiunge i feti passando attraverso la placenta. I soggetti spesso nascono morti e prematuri e presentano ascessi disseminati, granulomi in diversi organi quali fegato, milza, polmone, rene ed encefalo. I neonati sopravvissuti all'infezione nella vita intrauterina possono ammalarsi alcuni giorni dopo la nascita con infiammazione delle meningi e dell'encefalo, sepsi e morte.
- Nell'adulto: i malati possono manifestare: quadri setticemici con febbre, malessere generale e morte; quadri neurologici con infiammazione dell'encefalo, delle meningi e ascessi cerebrali; quadri focali con ascessi cutanei, congiuntiviti, infiammazioni di vari organi e tessuti.

I soggetti più a rischio di Listeriosi sono quelli con patologie intercorrenti (per esempio diabete, neoplasie), donne gravide, anziani, bambini e persone immunodeficienti ([http 1](#)).

## **1.6. Diagnosi**

La diagnosi inizialmente si basa sull'osservazione dei sintomi clinici che tuttavia possono rivelarsi aspecifici poiché simili a quelli determinati da altre malattie. La diagnosi di certezza di conseguenza, si effettua attraverso l'isolamento colturale del batterio da campioni biologici prelevati dal malato (sangue, liquido amniotico, placenta, secrezioni genitali ecc...). In caso di esito positivo, si provvede all'esecuzione dell'antibiogramma per conoscere l'antibiotico più adatto alla terapia. Inoltre la tipizzazione sierologica di *Listeria monocytogenes* risulta importante soprattutto nello studio di vasti focolai e viene eseguita per fini epidemiologici.

## **1.7. Metodi di analisi di riferimento**

Le tecniche tradizionali sono elaborate e lunghe; richiedono da 24 a 48 ore di coltivazione (arricchimento) seguiti da altri test. Il tempo totale di identificazione varia da 5 a 7 giorni, con i metodi tradizionali.

Previsti dal Regolamento (CE) 2073/2005 e stabiliti dall'Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione (ISO, norme 11920), sono i procedimenti che descrivono le modalità di ricerca e numerazione di *Listeria monocytogenes* nei prodotti destinati al consumo umano e animale:

- ISO 11920-1 (ricerca qualitativa), applicata ad alimenti pronti per lattanti o a fini medici speciali e alimenti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*, prima che non siano più sotto il controllo diretto di chi li produce.
- ISO 11920-2 (ricerca quantitativa), applicata ad alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*, immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità e alimenti che non costituiscono, invece, terreno favorevole.

## **1.8. Prevenzione, controllo, terapia**

Per ridurre il rischio di contaminazione degli alimenti possono essere utilizzate diverse strategie sia a livello industriale che familiare. In entrambi i casi risultano fondamentali le norme igieniche basilari (le cosiddette GMP: Good Manufacturing Practice). Essendo *Listeria monocytogenes* un germe resistente nell'ambiente esterno è fondamentale una rigorosa igiene delle attrezzature e una periodica opera di disinfezione di tali strumenti. Fra i processi tecnologici efficaci sul microrganismo si devono ricordare la cottura, il congelamento, la salatura e l'acidificazione. Per quanto concerne l'effetto del calore è stato

dimostrato che la pastorizzazione del latte riduce sensibilmente la sua contaminazione e altrettanto dicasi per le carni crude sottoposte a cottura. Anche il congelamento può rivelarsi un utile strumento di prevenzione sebbene le cellule del batterio possano in parte sopravvivere a questo processo. In merito all'acidificazione è stato osservato che l'acido acetico, l'acido lattico e l'acido citrico (presente nel limone) se utilizzati in certe quantità, inibiscono la crescita del germe. Inoltre a livello industriale l'impiego di conservanti, antiossidanti, emulsionanti ecc. possono essere un valido strumento di prevenzione. E' importante sottolineare che tutti questi mezzi profilattici potenziano la loro azione se associati. Quindi è possibile prevenire la malattia agendo sul livello di contaminazione del cibo ma non esiste invece la possibilità di proteggersi mediante vaccinazione. Una volta contratta la patologia, la terapia consiste nella somministrazione di antibiotico previo antibiogramma.

### **1.9. Frequenza**

Nel 2002, negli Stati Uniti, un'epidemia di listeriosi associata al consumo di carne di tacchino contaminata ha avuto come effetto 54 casi di malattia, otto morti e tre aborti in nove stati diversi.

In Europa, la metà dei casi notificati sembra derivare da assunzione di latte crudo e prodotti lattiero-caseari: episodi si sono verificati nel 1983 e nel 1987 in Svizzera, per formaggi molli non pastorizzati, nel 1986 in Austria per consumo di latte non pastorizzato e nel 1995 in Francia per Brie a base di latte non pastorizzato.

In Italia, nel maggio 1997, un'epidemia di listeriosi derivata dal consumo d'insalata di mais e tonno contaminato, utilizzato nelle insalate, ha coinvolto oltre 1500 persone. Inoltre, nell'anno 2005, il Ministero della Salute ha raccolto nel contesto del sistema di allerta, un numero di 117 notifiche. Nella regione Lazio, nel periodo compreso fra il 1997 e il 2000, sono stati notificati quattro casi di Listeriosi.

Nel 2004, ad eccezione di Cipro, Lussemburgo e Malta tutti gli Stati membri dell'Unione Europea e la Norvegia hanno segnalato 1267 casi di listeriosi che rappresenta un'incidenza di 0,3 casi per 100.000 abitanti, la stessa incidenza nel 2003.

L'incidenza riportata nel 2004 è stata confrontata con la media dei cinque anni precedenti. Tutti gli Stati membri ad eccezione della Svezia, hanno riportato un aumento dei casi di listeriosi (Figura 1).

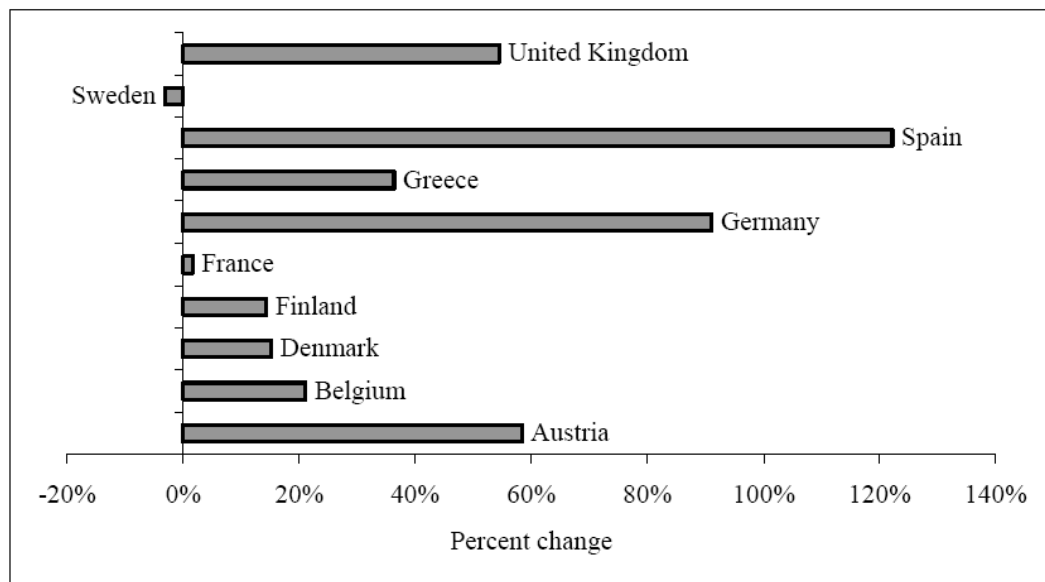


Figura 1: Percentuali relative al cambiamento di incidenza tra il 2004 e 5 anni precedenti (1999-2003) (Khelef N. et coll., 2006).

Recentemente, fine agosto del 2008, è scoppiata un'epidemia di listeriosi in Canada dovuta al consumo di carne e a prodotti a base di carne della *Maple Leaf Foods*.

## 2. FRUTTA

### 2.1. Prodotti di IV gamma

Negli ultimi anni il comparto dell'ortofrutta della IV gamma ha riscosso un notevole successo commerciale e il settore manifesta un continuo *trend* di crescita. Il successo di questo prodotto deriva dalla elevata qualità delle materie prime, dall'assenza di conservanti, coloranti e liquidi di governo, dalla praticità d'uso. Vengono confezionati sia prodotti singoli (ananas, cocco, melone, kiwi e anguria) che prodotti misti; varietà esotiche come mango, papaia e ananas affiancano frutta mediterranea come melone, mela, arancia, uva, kiwi e pesca nettarina. A livello nazionale vengono commercializzati prevalentemente ananas (33%), cocco (22%), misto mediterraneo (20%), misto esotico (11%), e melone (4%) (Mioni e coll., 2008).

La categoria dei prodotti di IV gamma è rappresentata da alimenti preparati e confezionati in modo da fornire alle esigenze del consumatore, singolo individuo o ristorazione collettiva, una serie di servizi (pulizia, mondatura, lavaggio, taglio in unità o sub-unità pronte all'uso).

I prodotti che rientrano nella IV gamma sono costituiti principalmente da verdure e ortaggi, ma anche da frutta come cocco, melone, mela, kiwi,



cocomero, pesca, uva. Essendo prodotti freschi hanno una vita commerciale limitata e la conservazione deve avvenire a temperature di refrigerazione (0-4°C).

## **2.2. Modalità di preparazione della frutta**

Dopo la coltivazione e la raccolta, i vegetali sono trasportati allo stabilimento di lavorazione dove vengono posti nelle medesime condizioni in cui saranno poi utilizzati dal consumatore finale. Tutte le fasi del processo, descritte in figura 2, sono pianificate con cura meticolosa.

I processi per arrivare al prodotto finito sono tutti manuali e prevedono il lavaggio della frutta esternamente, la pelatura, il taglio manuale in pezzettoni, il frazionamento sempre manuale in vaschette.

Di particolare importanza è la fase finale del processo di produzione degli ortaggi con il confezionamento che avviene in vassoi di poliestere chiusi da pellicola trasparente termosaldata. Il rivestimento deve essere trasparente per dare la possibilità al consumatore di valutare l'aspetto esteriore del prodotto.

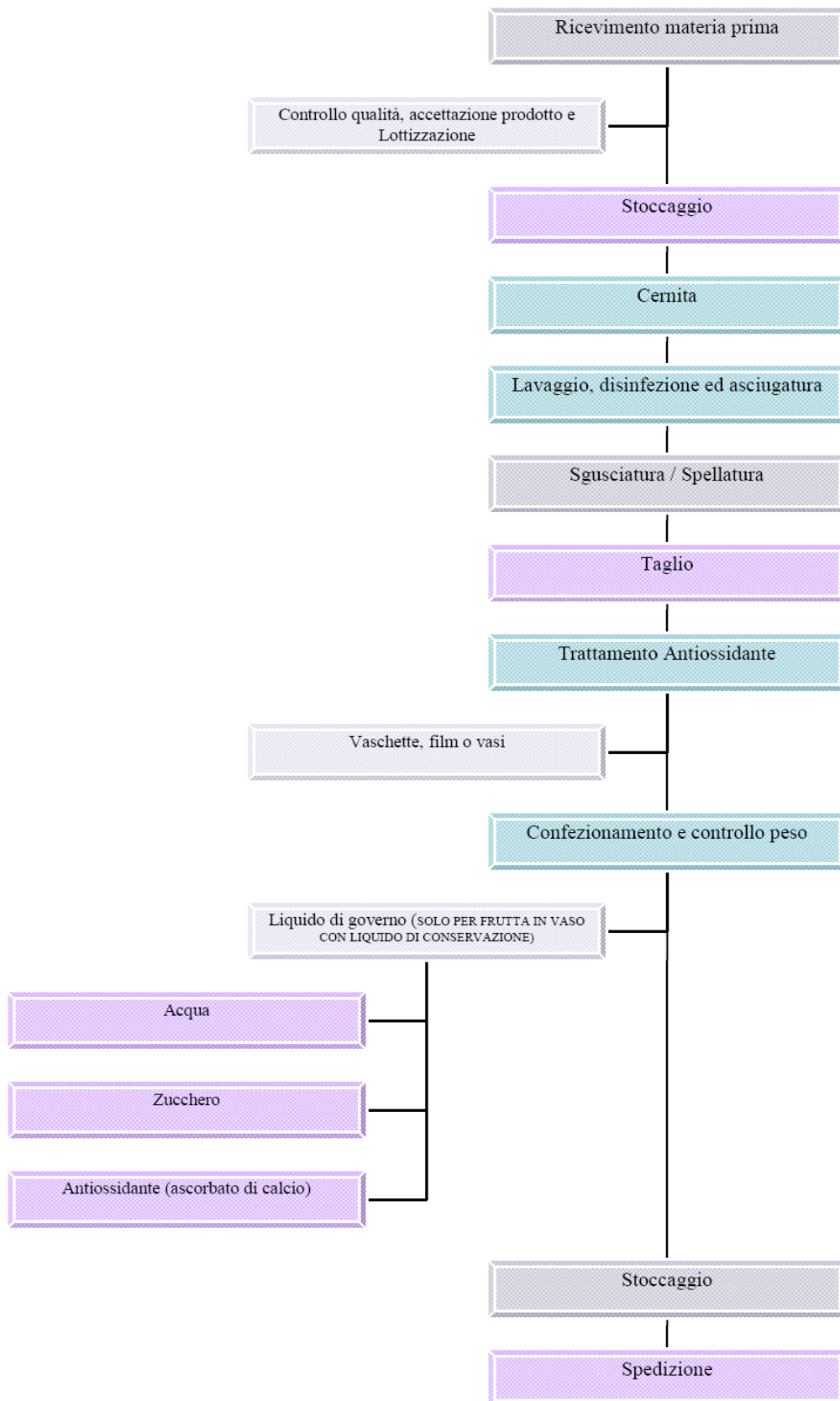


Figura 2: schematizzazione del flow chart 1

In una moderna azienda dove si producono alimenti di IV gamma si distinguono tre “macro zone” di produzione denominate dagli addetti ai lavori (figura 2):

- zona nera (dal ricevimento alla sgusciatura);
- zona bianca (dal taglio al confezionamento);
- zona grigia (stoccaggio e spedizione).

La prima è composta dal ricevimento della materia prima, dallo stoccaggio “prodotto sporco”, dalla mondatura e cernita e dalle prime vasche di lavaggio. Si caratterizza dalla flora microbica derivante dall’ambiente esterno e la fase di contaminazione è strettamente primaria; può esserci anche contaminazione crociata, qualora vi sia contatto con le superfici sporche.

La zona bianca è costituita dalle ultime vasche di lavaggio, dall’asciugatura al confezionamento ed è in queste fasi che si possono verificare maggiormente contaminazioni crociate o ad opera dell’operatore che non rispetta le norme igieniche.

La terza zona è costituita dallo stoccaggio e spedizione dove il prodotto è sigillato all’interno della confezione. Fondamentale rimane la temperatura di stoccaggio (0 - 4°C) per il contenimento della carica microbica.

### **2.3. I moderni sistemi di confezionamento della frutta di IV gamma**

Il confezionamento del prodotto di IV gamma, in atmosfera controllata è uno dei moderni metodi di confezionamento industriale che assicura il mantenimento delle caratteristiche fisiche del prodotto per tutta la durata della sua *shelf life*.

In generale, è noto che l’aria presente nell’ ambiente (trascurando le polveri e le particelle solide) è composta da una miscela di gas e due di questi sono presenti in maniera rilevante:

- AZOTO ( N<sub>2</sub>) con il 78% e
- OSSIGENO ( O<sub>2</sub>) con il 21%.

L’ossigeno è la componente dell’aria che sostiene la vita ed è un gas attivo; l’azoto è relativamente inerte e si combina con altre sostanze a temperature superiori. In percentuali molto minori si trovano nell’aria anche vapore acqueo, anidride carbonica, gas nobili inerti.

Il confezionamento in ambienti controllati (di seguito definito MAP, *Modified Atmosphere Packaging*) è una delle tecniche più utilizzate nel settore alimentare.

La sostituzione dell’aria ambiente con un gas inerte consente di migliorare la conservazione degli alimenti, ottimizzando le tecniche di confezionamento, riducendone gli scarti e aumentandone la qualità. Il problema principale che le aziende di confezionamento di generi alimentari devono risolvere è il deterioramento degli alimenti che è diretta conseguenza dell’ ossidazione derivante dalla presenza di ossigeno nell’aria ambiente. L’utilizzo di un gas inerte, assicura l’ottima

conservazione dei cibi mantenendone inalterate le caratteristiche proteiche e organolettiche.

Il MAP può essere utilizzato per prevenire i seguenti effetti:

*- Rancidità da ossidazione.*

E' causata dalla ossidazione degli acidi grassi insaturi, con produzione di cattivi odori e cambiamenti di colore, soprattutto in noccioline, arachidi, patatine fritte, e tutti gli snacks in genere. La riduzione della rancidità, può essere ottenuta con il contenimento della percentuale di O<sub>2</sub> all'interno della confezione a un valore inferiore al 2%. La quantità, quindi, di N<sub>2</sub> richiesta per questo tipo di convezionamento 99.5% ( equivale ad un tenore residuo di ossigeno pari a 0.5%).

*- Deterioramento causato dagli insetti.*

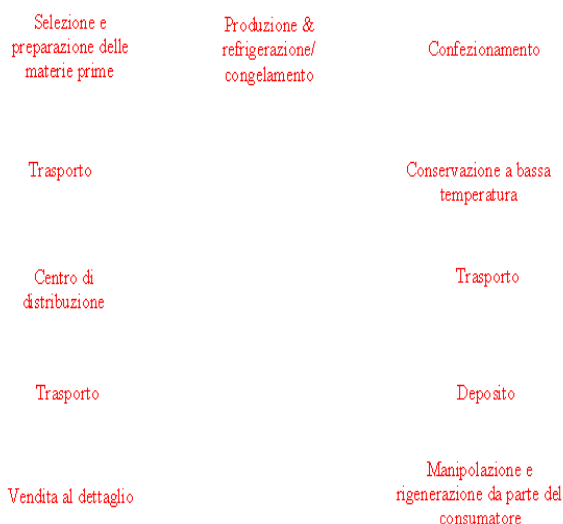
Anche l'azione degli insetti può essere fonte di danneggiamento degli alimenti se non opportunamente confezionati e protetti. Il confezionamento con azoto con grado di purezza maggiore od uguale al 98%, inibisce l'azione degli insetti (http 4.).

## 2.4. Metodi di conservazione dei prodotti di IV gamma

Per alimento conservato si intende qualsiasi prodotto sottoposto a processi finalizzati a preservarne le caratteristiche nutrizionali e sensoriali, mettendolo al riparo, per un periodo più o meno lungo, da ogni alterazione che ne comprometta l'edibilità.

Le tecniche di conservazione degli alimenti comprendono essenzialmente:

- tecniche di conservazione per azione del freddo;
- tecniche di conservazione per azione del calore;
- tecniche di conservazione con altri sistemi.



Di particolare importanza per la conservazione dei prodotti di IV gamma è la tecnica di conservazione per azione del freddo (figura 3). Per catena del freddo si intende quell'insieme di processi nel corso dei quali il prodotto viene sottoposto a raffreddamento e conservazione.

Figura 3 Schema raffigurante la catena del freddo

Le tecniche di raffreddamento comprendono: refrigerazione, congelamento e surgelazione.

La refrigerazione consiste nel raffreddare gli alimenti a una temperatura inferiore a quella ambientale, ma superiore a  $-1^{\circ}\text{C}$ . Ciò consente di conservare gli alimenti per brevi periodi di tempo, da qualche giorno a qualche settimana, in quanto le attività microbiche e le reazioni di alterazione di natura chimica, fisica e biochimica risultano notevolmente rallentate. Va osservato che i prodotti refrigerati sono comunque deperibili e che la loro qualità diminuisce all'aumentare del tempo di conservazione. La sicurezza igienico-sanitaria e la qualità dei prodotti refrigerati debbono essere garantite attraverso il controllo delle possibili fonti di contaminazione durante le fasi di lavorazione (Figura n gestione della catena del freddo) distribuzione ed esposizione nei banchi di vendita, nonché durante la conservazione domestica. La catena del freddo è di fondamentale importanza al fine di garantire la sicurezza e la qualità degli alimenti refrigerati e congelati. Il principale strumento a nostra disposizione è il monitoraggio continuo della temperatura in ogni punto della catena.

La catena del freddo può essere interrotta per:

- tragitti di consegna brevi con fermate frequenti che richiedono continua apertura dei cassettoni refrigerati degli automezzi;
- attese prolungate di automezzi alla consegna dei bancali scaricati fuori dalle celle;
- abbandono al di fuori dei banchi frigoriferi per troppo tempo;
- non corretta calibrazione dei termometri delle celle e/o dei banchi frigoriferi.

Tutto questo contribuisce alla libera proliferazione di *Listeria monocytogenes* che se presente a causa di una contaminazione accidentale durante il processo di lavorazione, può proliferare incontrollata. Per garantire quindi la sicurezza del consumatore si ricorre all'osservanza del Regolamento (CE) n. 2073 del 15 novembre 2005 descritto in seguito.

## **2.5. I vantaggi del “MAP”**

Uno degli esempi più significativi dell'azione del “MAP” proviene dal confezionamento delle patatine fritte, che contengono dopo la fase di cottura una notevole quantità di olio residuo. L'ossigeno reagisce con l'olio, provocando un decadimento delle qualità delle patate rendendole rancide. Le confezioni di patatine vengono riempite di azoto durante la fase di confezionamento, rendendo l'ambiente all'interno delle confezioni inerte alle azioni ossidanti dell'ossigeno.

Anche nel confezionamento del caffè e del latte in polvere l'azoto svolge un ruolo di importanza strategica, assicurando il mantenimento delle qualità degli alimenti nel tempo.

L'importanza dell'utilizzo di atmosfere inerti nel confezionamento di generi alimentari, assume il duplice ruolo di mantenimento e conservazione degli

alimenti e di riduzione di tutte le sostanze chimiche precedentemente utilizzate (conservanti) per evitare il decadimento degli alimenti. Alcuni esempi di alimenti confezionati in ambienti con N<sub>2</sub>: Caffè, Latte in polvere, noccioline e arachidi, cereali, patatine fritte e snacks di vario tipo, spezie ed aromi, tea in polvere e pasta secca.

## 2.6. Gas utilizzati per il “MAP”

I gas maggiormente utilizzati nel confezionamento con atmosfera modificata sono l'azoto, l'anidride carbonica e l'ossigeno. Gli alimenti vengono normalmente confezionati in varie miscele di questi gas o, in molti casi, con il solo azoto.

-*Azoto*: è considerato il più inerte, completamente inodore, insapore e incolore; ha effetti sulle lipasi, proteasi e decarbossilasi inibendole; mantiene il rigonfiamento della confezione;

-*Anidride carbonica*: è un ottimo inibitore di batteri e muffe (batteriostatico); è solubile nell'alimento, dove ne provoca l'acidificazione con possibile denaturazione delle proteine. Ha effetti importanti sui vegetali inibendone la respirazione e di conseguenza ne rallenta la loro maturazione;

- *Ossigeno*: serve principalmente per mantenere vivo il colore rosso delle carni (unico vantaggio) e inibisce gli anaerobi patogeni, tuttavia provoca l'ossidazione dei grassi.

L'efficacia del MAP è strettamente correlata alla tipologia di imballo che deve assicurare una totale impermeabilità dell'atmosfera esterna oltre all'isolamento dei cibi dall'umidità. Alcuni tipi di confezionamento richiedono inoltre che i cibi vengano protetti anche dalla luce. A tale proposito l'imballo dovrà essere opportunamente progettato con l'utilizzo di materiali in grado di preservare il contenuto dalla luce.

Per frutta e verdura si può anche usare l'atmosfera passiva confezionando il prodotto in pellicole ad alta impermeabilità e lasciando al suo interno aria. L'alimento consuma così O<sub>2</sub> ed emette CO<sub>2</sub>.

Il materiale di confezionamento per frutta e verdura si usano in genere polipropilene siliconato (PP) che offre una buona resistenza termica e stabilità dimensionale e combinati di etilene-vinilacetato (EVA) e polietilene.

### 3.Regolamento (CE) n. 2073 del 15 novembre 2005

Il regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari fa parte dei regolamenti costituenti il “pacchetto igiene” ed è entrato in vigore il 10 gennaio 2006.

Con esso vengono fissati i criteri microbiologici rilevanti, efficaci e significativi basati sulla “valutazione del rischio”, che vanno a sostituire i limiti microbiologici previsti dalla normativa precedentemente vigente. Lo scopo del regolamento è di garantire alimenti sicuri, che non contengano tossine o microrganismi in quantità tale da essere rischiosi per la salute umana. Vengono definiti due tipologie di criteri (art. 2):

- quello di sicurezza alimentare che definisce l'accettabilità di un prodotto alimentare e si applica per i prodotti immessi sul mercato per l'intera durata del periodo di conservabilità in condizioni prevedibili di distribuzione, conservazione ed uso;
- quello di igiene di processo che definisce l'accettabilità di un processo di produzione e si applica solo ai prodotti prelevati durante la produzione.

Gli OSA devono effettuare, nei modi appropriati, analisi per verificare il rispetto dei criteri microbiologici e stabiliscono la frequenza con la quale effettuare i campionamenti, salvo quando il regolamento indichi una frequenza specifica (art. 4).

Qualora non siano rispettati i criteri di sicurezza, il prodotto o la partita di prodotti alimentari devono essere ritirati o richiamati dal commercio (art.7).

Tra i patogeni inclusi nei criteri di sicurezza alimentare vi è *Listeria monocytogenes*, la cui presenza non è tollerata in diverse matrici alimentari, mentre per altre (alimenti pronti non destinati a lattanti e a fini medici speciali, preparazioni e prodotti a base di carne destinati ad essere consumati crudi, carni macinate, burro-gelati e formaggi, alimenti pronti contenenti uova crude, succhi di frutta e frutta/ortaggi pre-tagliati) è ammissibile una carica fino a 100 UFC/g-ml su 5 unità campionarie, purché gli OSA siano in grado di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che questo limite non verrà superato per tutta la durata commerciale del prodotto, fino a scadenza (allegato 1, capitolo 1).

Il regolamento introduce una distinzione tra alimenti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes* e alimenti che non

costituiscono terreno favorevole, basata sulle caratteristiche chimico-fisiche dell'alimento e sulla durata della sua *shelf-life*. Sono considerati alimenti non favorevoli la crescita del patogeno (allegato 1, capitolo 1, nota 8):

- i prodotti con  $pH \leq 4,4$  o  $A_W \leq 0,92$
- i prodotti con  $pH \leq 5$  e  $A_W \leq 0,94$
- I prodotti con valori di pH e  $A_W$  superiori a quelli sopra indicati, se la conservabilità è  $< 5$  giorni.

Negli alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole per la crescita di *Listeria monocytogenes* viene ammessa una tolleranza fino a 100 UFC/g per tutta la durata commerciale del prodotto (allegato 1, capitolo 1, punto 1.3), mentre per quelli che costituiscono terreno favorevole, non è tollerata la presenza di *L. monocytogenes* in 25 g di prodotto, a meno che il produttore non sia in grado di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che il sopraddetto limite di 100 UFC/g non verrà superato per tutta la durata commerciale del prodotto (allegato 1, capitolo 1, punto 1.2, nota numero 5).

Per dimostrare che *Listeria monocytogenes* eventualmente presente non supererà il limite previsto, l'OSA può avvalersi di prove per la determinazione delle caratteristiche chimico-fisiche del prodotto, dati di letteratura, modelli matematici di microbiologia predittiva, prove di contaminazione sperimentale come il *challenge test* (articolo 3, paragrafo 2 e allegato II).

Qualora l'OSA non sia in grado di fornire tali informazioni all'Autorità Sanitaria, in sede di controllo ufficiale viene richiesta l'assenza del patogeno su 25 grammi di prodotto in 5 unità campionarie.

In tutti i casi in cui non vengano rispettati i criteri di sicurezza previsti per *Listeria monocytogenes* (a seconda dei casi assenza del patogeno o superamento del limite di 100 UFC/g, laddove applicabile), il Laboratorio incaricato del Controllo Ufficiale notifica la non conformità all'autorità competente, previa garanzia del diritto alla difesa del produttore (analisi di revisione/ripetizione di analisi), conformemente a quanto previsto dalla normativa vigente (Legge 283/1962, D.P.R. 327/1980).

Categoria alimentare	microrganismo	piano di campionamento		limiti	fase in cui si applica il criterio
		n	c		
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>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 UFC/g	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità



		5	0	assente in 25 g	Prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce
Alimenti pronti che NON costituiscono terreno favorevole alla crescita di L.m., diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	Listeria monocytogenes	5	0	100 UFC/g	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

Tabella 2 limiti di *Listeria monocytogenes* in alcune categorie di alimenti secondo il regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre (n: numero di unità che costituiscono il campione; c: numero di unità campionarie)

#### 4. SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro rappresenta uno studio preliminare sulla dinamica di *L. monocytogenes* artificialmente introdotta in matrici alimentari ortofruitticole appartenenti ai prodotti di IV gamma (melone e cocco) alla temperatura di 4°C e in condizioni di abuso termico (8 e 12 °C).

Tale situazione potrebbe verificarsi in una delle varie fasi di lavorazione del prodotto, infatti, nel caso di una contaminazione accidentale potrebbe verificarsi un successivo sviluppo microbico sopra i limiti consentiti dal Regolamento (CE) n. 2073/2005. A contribuire alla moltiplicazione del patogeno poi potrebbero intervenire errati trattamenti di conservazione, in particolare durante le fasi di trasporto e di vendita nei banchi frigoriferi, dove notoriamente si superano spesso le temperature prescritte ( $\leq +4^{\circ}\text{C}$ ), con interruzione della catena del freddo.

Lo scopo, quindi di questo lavoro è sorto dal desiderio di un'azienda produttrice di frutta di IV gamma di verificare se *Listeria monocytogenes* è in grado di sopravvivere e svilupparsi in questi prodotti che da poco tempo sono stati immessi sul mercato, al fine di tutelare il consumatore e rispettare i dettami del Regolamento Ce 2073/2005.

È stata, inoltre, valutata la carica microbica totale, i batteri lattici e i lieviti al fine di ottenere una panoramica generale sulla situazione microbiologica della frutta considerata.

## 5. MATERIALI E METODI

### 5.1. Matrici alimentari

Per valutare quali tipi di frutta possono rappresentare terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes* si sono presi in considerazione più frutti e si sono misurati i loro valori di pH e  $A_w$  (tabella 3)

<b>frutto</b>	<b>pH</b>	<b><math>A_w</math></b>
Mela	4.36	0.985
Melone	6.13	0.986
Cocco	6.16	0.983
Ananas	3.67	0.987
Kiwi	3.57	0.986

Tabella 3

In considerazione di quanto riportato nel Regolamento CE n. 2073 del 2005, relativamente al valore di pH (se inferiore a 4.4 si ha ostacolo allo sviluppo del patogeno), melone e cocco rappresentavano i frutti con pH

non inferiore a tale valore; si è, quindi, proceduto con la sperimentazione utilizzando questi due frutti. Altre caratteristiche riguardanti cocco e melone sono descritte nella tabella 4.

FRUTTI	Acqua	Proteine	Lipidi	Carboidrati	Zuccheri solubili	Energia kJ
<b>Cocco</b>	50,9	3,5	35,0	9,4	9,4	364
<b>Melone</b>	90,1	0,8	0,2	7,4	7,4	33

Tabella 4. composizione chimica e valore energetico degli alimenti per 100 g di parte edibile

I campioni prelevati nell'azienda donatrice sono stati trasportati presso il laboratorio di Microbiologia degli alimenti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie a temperatura controllata di 4°C.



Figura 4. a vaschetta di cocco

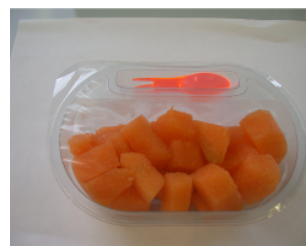


Figura 4.b vaschetta di melone

## 5.2. Allestimento dell'inoculo

La sperimentazione ha previsto la contaminazione artificiale del prodotto per mettersi nelle stesse condizioni in cui si potrebbe trovare il consumatore al momento dell'acquisto delle vaschette.

Per le sue caratteristiche intrinseche è difficile trovare una carica di 100 UFC/g quindi si sono inoculate due quantità più probabili:

- inferiore a 10 UFC/g (quantità che non si può conoscere precisamente) che rappresenta una possibile contaminazione accidentale durante la lavorazione e preparazione della frutta e
- 10 UFC/g che simula qualcosa che in natura avviene difficilmente cioè quando durante il processo di lavorazione non sono eseguite le buone pratiche di lavorazione da parte del personale operante, che utilizza utensili sporchi o mal sanificati, superfici non correttamente deterse e sanitizzate, ecc.

Il ceppo di *L. monocytogenes* che si dovrebbe utilizzare dovrebbe essere appropriato, ossia isolato precedentemente dalla stessa matrice

alimentare. Tuttavia, il patogeno non è mai stato isolato direttamente dalla frutta presso il laboratorio dove è stata effettuata la sperimentazione. Quindi, è stato utilizzato il ceppo batterico di *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 congelato a -80°C. La sua rivitalizzazione è stata effettuata mediante striscio in piastra sul terreno di arricchimento Tryptone Soia Agar con 0,6% di Yeast Extract (TSA+YE, BIOLIFE+LABM), incubato a 37°C per 24 ore. Dalla patina cresciuta sulla piastra, si prelevava un'ansata, che veniva stemperata in una soluzione fisiologica e vortexata in modo da divenire una sospensione il più omogenea possibile.

Prove precedenti confermano che una densità ottica pari a 1OD corrisponde a un titolo di circa  $1,2 \times 10^9$  UFC/ml. E' stato, quindi, preso questo valore come riferimento per i calcoli successivi.

Un ml del preparato è stato messo in una cuvetta e se ne è letta la sua densità ottica allo spettrofotometro (lettura eseguita a 600nm). Attraverso la proporzione:

$$\text{OD letta: } 1\text{ml}=1\text{OD}:X\text{ml}$$

Dalla formula si ricavano quanti ml di preparato si devono prelevare per avere 1OD corrispondente. Quindi viene aggiunta una quantità di soluzione fisiologica che manca per arrivare a 1ml. Si ottiene 1ml di preparato che ha una OD pari a 1 e, sapendo che questa quantità contiene  $1,2 \times 10^9$  UFC, si fanno le diluizioni fino ad arrivare ai valori richiesti cioè 175 UFC/tot per la contaminazione <10UFC/g (ottenuto prendono 5UFC, ad esempio e moltiplicandoli per i grammi in ciascuna vaschetta, 35g) e 350 UFC/tot (ottenuto prendendo 10 UFC e moltiplicando anch'esso per i grammi contenuti nella vaschetta, 35g).

### 5.3. Contaminazione della frutta

Dopo la preparazione dell'inoculo si passa in una stanza preparata per svolgere il passaggio successivo cioè la contaminazione della frutta.

In ogni vaschetta era inserita una quantità di frutta pari a 35 g, sufficiente alle analisi microbiologiche relative alla ricerca di patogeno e alle altre cariche microbiche (CMT, lieviti e batteri lattici); in esse erano poi inoculate le quantità di *L. monocytogenes* sopra riportate.

Per ogni lotto di frutta (sia cocco che melone), sono state utilizzate 36 vaschette (tabella 5), così impiegate:

- 6 per ciascun inoculo del patogeno;
- 6 per le varie temperature di conservazione (4, 8 e 12 °C)

Ogni vaschetta era poi analizzata giornalmente fino alla sua scadenza che il produttore ha stabilito in 6 giorni compreso il giorno di produzione.

N° vaschette per inoculo e per temperatura	<10 UFC	10 UFC	Tot vaschette per ciascuna temperatura
-----------------------------------------------	---------	--------	-------------------------------------------

<b>4°C</b>	6	6	12
<b>8°C</b>	6	6	12
<b>12°C</b>	6	6	12
<b>Tot vaschette per diversi inoculi</b>	18	18	<b>36 TOT</b>

Tabella 5

Per avere risultati statisticamente significativi la sperimentazione è stata eseguita 6 volte a partire da materie prime appartenenti a lotti diversi. Complessivamente sono state contaminate 432 vaschette.

L'inquinamento dei campioni era effettuato nel seguente modo: con una pipetta a puntali sterili si prelevava 1ml di sospensione batterica contenente la contaminazione di <10 UFC e si distribuiva il più uniformemente possibile sui vari pezzetti nella vaschetta (figura 5a); la stessa cosa era poi fatta con la sospensione contenente 10 UFC. Ciascuna vaschetta era successivamente sigillata in sacchetti utilizzando un apposito strumento (figura 5b).

Il melone era confezionato in atmosfera naturale aggiungendo un antiossidante (ascorbato di calcio); mentre il cocco si confezionava in atmosfera protettiva con ridotto tenore di ossigeno (80% N<sub>2</sub>, 8% O<sub>2</sub>, 12%

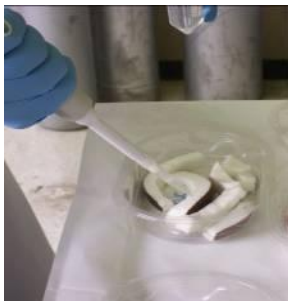


Figura 5.a



Figura 5.b

CO<sub>2</sub>) in quanto l'aggiunta di un antiossidante non è sufficiente per evitare l'ingiallimento.

Ciascun gruppo di vaschette era poi conservato alla temperatura di refrigerazione rispettiva.

#### 5.4. Prelievo e modalità di campionamento

Il giorno stesso della contaminazione e nei giorni seguenti, venivano analizzate le vaschette inoculate. In particolare, si effettuava il prelievo dei campioni in condizioni di sterilità, quindi in prossimità di un bunsen e con cucchiaio sterile, si pesava la quantità richiesta per l'analisi:

- 10 g per la ricerca di *Listeria monocytogenes*
- 20 g per le altre cariche microbiche
- 5 g per i parametri chimico-fisici.

Per la ricerca quantitativa i rispettivi grammi erano posti in sacchetti di plastica per stomacher e omogeneizzati con STOMACHER 400 (LABORATORY BLENDER Steward).

Come illustrato in tabella 6. tutti i giorni si eseguono le analisi per quantificare *Listeria monocytogenes* sia per il melone che per il cocco e si misura il pH e Aw.

	1°	2°	3°	4°	5°	6°
Listeria	x	x	x	x	x	x
pH, Aw	x	x	x	x	x	x
CPT	x		x			x
CMT	x		x			x
Batt. Lattici	x		x			x
Lieviti	x		x			x

Tabella 6

Le analisi di CPT (= carica psicrotrofa totale) e CMT (= carica mesofila totale) insieme a quelle dei batteri lattici e dei lieviti vengono eseguite per poter meglio comprendere l'evoluzione delle flore competitive con *Listeria monocytogenes*.

## 5.5. Schema delle analisi

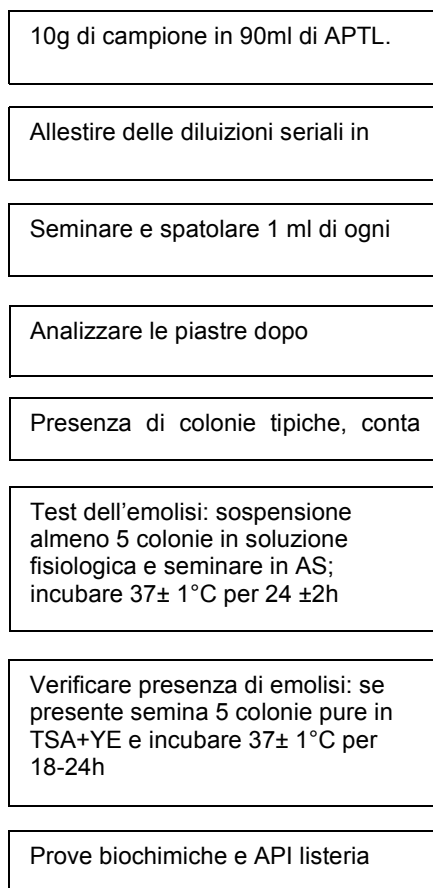
Le analisi microbiologiche sono state condotte nello stesso laboratorio utilizzando i metodi di prova previsti dal regolamento Ce n. 2073/2005.

### 5.5.1. Determinazione quantitativa di *Listeria monocytogenes*

La numerazione di *Listeria monocytogenes* è stata eseguita secondo procedura trascritta dall'elaborazione della seguente norma:

- ISO 11290-2 (2007).

Il seguente diagramma sintetizza la procedura applicata derivata dalla norma sopra citata



L'analisi è basata sul rilevamento di colonie caratteristiche in piastra a  $37^{\circ}\text{C}$ .

- Preparare la sospensione iniziale omogeneizzando 10 g di alimento in 90 ml di Acqua Peptonata Tamponata per *Listeria* (APTL, MERCK). Lasciare la sospensione iniziale per 1 h ± 5' a 20 ± 2°C per rivitalizzare i microrganismi stressati. Dal campione omogenato con APTL, allestire le successive diluizioni (al massimo arrivare alla diluizione 10<sup>-3</sup>), mediante l'uso di Soluzione Triptone (ST, LABM).

- Predisporre sul banco di lavoro due piastre di AGAR LISTERIA ACC. TO OTTAVIANI & AGOSTI (ALOA, BIOLIFE,) per ciascuna delle diluizioni da seminare. Utilizzando una pipetta sterile, versare nel centro di ciascuna piastra di terreno 0,1 ml della sospensione iniziale. Distribuire uniformemente per spatolamento senza toccare i bordi della piastra, utilizzando una spatola sterile per ciascuna diluizione. Come previsto dal regolamento (CE) 2073/2005, quando è necessario stimare bassi valori di *Listeria monocytogenes*, il limite di numerazione può essere abbassato di un fattore 10 esaminando 1 ml della sospensione iniziale. In tal caso, distribuire con la spatola 1 ml di inoculo suddiviso (0,3 + 0,3 + 0,4 ml) sulla superficie di tre piastre di ALOA da 90 mm di diametro. Incubare le piastre di ALOA in posizione capovolta, in pile di massimo sei piastre, distanti tra loro almeno 25 mm, a 37 ± 1°C per 24 ± 3 h o ulteriori 24 ± 3 h.

Le colonie sospette appaiono di colore verde-azzurro, circondate da un alone opaco. Contare tutte le colonie caratteristiche di inoculo suddiviso (0,3 + 0,3 + 0,4ml) sulla superficie di tre piastre di ALOA da 90 mm di diametro.

Incubare le piastre di ALOA in posizione capovolta, in pile di massimo sei piastre, distanti tra loro almeno 25 mm, a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  per  $24 \pm 3$  h o ulteriori  $24 \pm 3$  h.

Le colonie sospette appaiono di colore verde-azzurro, circondate da un alone opaco (figura 6). Contare tutte le colonie caratteristiche.

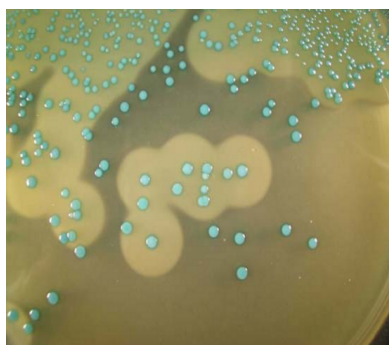


Figura 6: Colonie di *L.monocytogenes* (verde-blu con alone opaco) e *L.innocua* (colonie verdeblu senza alone su ALOA).

#### Conferma di Listeria spp.

- Selezionare almeno 5 colonie sospette o tutte, se presenti in numero inferiore, da ciascuna piastra di ALOA e procedere con il Test dell'emolisi: stemperare ogni colonia in 1 ml di Soluzione Fisiologica e strisciare in Agar Sangue (AS - BIOLIFE) in modo da ottenere colonie ben separate. Contemporaneamente seminare un controllo positivo di *Listeria monocytogenes* ed un controllo negativo di *Listeria innocua*. Dopo incubazione, *Listeria monocytogenes* mostra una limitata zona trasparente,  $\beta$ -emolisi (figura 7). *Listeria innocua* mostra emolisi.

- Procedere alla semina delle colonie emolitiche strisciandole in TSA+YE (Tryptone Soia Agar + 0,6% di estratto di lievito – LABM) e incubare a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . per 18-24 h o fino a crescita soddisfacente.

Le colonie tipiche sono convesse, 1-2 mm di diametro, incolori e opache con bordo intero.

- Effettuare da esse le seguenti prove biochimiche di conferma.



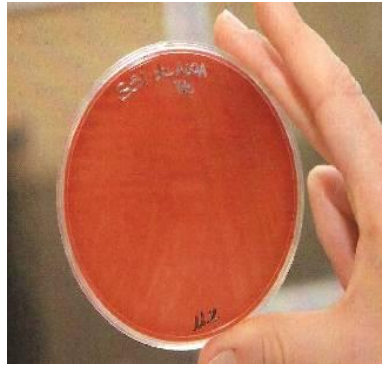


Figura 7: Piastra di *Listeria* in AS

#### Colorazione di GRAM:

è una tecnica che permette di descrivere la morfologia dei batteri e la loro classificazione in due gruppi in base alla capacità di trattenere o meno il colore viola del cristalvioletto nelle condizioni del test. Tale tecnica è basata sulla ISO 7218 (2007)

La tecnica prevede:

1- allestire un vetrino per microscopio fissando sulla fiamma un leggero strato di colonia batterica (stemperata in una goccia di soluzione fisiologica) da coltura di circa 18-24 ore.

2- Coprire il vetrino con soluzione di cristal-violetto e lasciare in contatto per 1 minuto; risciacquare delicatamente la superficie del vetrino con acqua per pochi secondi, tenendola inclinata.

3- Coprire il vetrino con soluzione iodata e lasciare in contatto per 1 minuto; risciacquare delicatamente la superficie del vetrino con acqua per pochi secondi, tenendola inclinata.

4- Disporre delicatamente e con continuità un film di etanolo (95%) sulla superficie inclinata del vetrino per un periodo non superiore a 30 secondi in modo da determinare l'allontanamento del color violetto ma non di altro; risciacquare delicatamente la superficie del vetrino con acqua per pochi secondi, tenendola inclinata.

5- Coprire il vetrino con soluzione di safranina per 10 secondi risciacquare delicatamente la superficie del vetrino con acqua per pochi secondi tenendo la superficie inclinata.

6- Asciugare il vetrino e osservare al microscopio con l'obbiettivo a immersione ad alta luminosità.

Le cellule batteriche che appaiono blu-violetto sono chiamate Gram-positive; quelle che appaiono rosa scuro o rosso sono chiamate Gram-negative.

Catalasi: porre una goccia di acqua ossigenata su un vetrino; stemperarvi una colonia; la comparsa di bolle di gas (O<sub>2</sub>) indica la presenza dell'enzima catalasi: reazione positiva.

CAMP test: strisciare i ceppi di *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Rodococcus equi* (ATCC 6939) verticalmente in singola *linea* su una piastra di AS in modo tale che le due colture siano parallele e diametralmente opposte come mostrato in figura 8. E' richiesto un inoculo sottile che può essere ottenuto tenendo l'ansa o l'ago perpendicolare con l'agar. Strisciare orizzontalmente la colonia da testare perpendicolarmente alle colture di *Staphylococcus aureus* e *Rodococcus equi* in modo da lasciare da queste una distanza di 1 o 2 mm.

Contemporaneamente strisciare le colture di controllo *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932), *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Listeria ivanovii* (ATCC 19119). Incubare a 37°C ± 1°C per 18-24h.

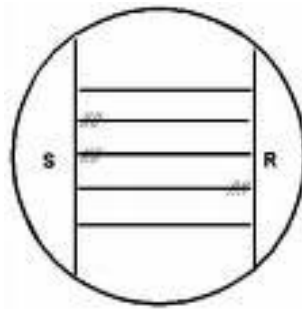


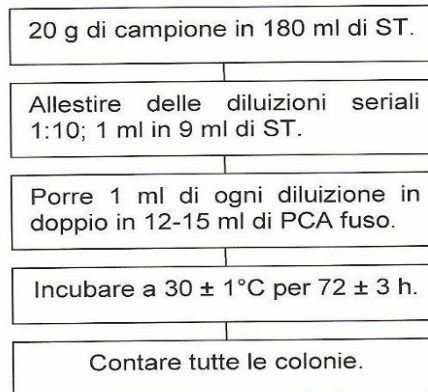
Figura 8: CAMP test

Un alone di  $\beta$ -emolisi più evidente nell'intersezione del ceppo da testare con ciascuna delle colture di *Staphylococcus aureus* e *Rodococcus equi* è considerato essere una reazione positiva. La reazione positiva a *Rodococcus equi* si evidenzia con un ampio alone (da 5 a 10 mm) di emolisi "a punta di freccia". La reazione è negativa se un piccolo alone debolmente emolitico si estende per solo 1 mm circa dall'intersezione del ceppo da testare con la crescita di *Rodococcus equi*. La reazione positiva con *Staphylococcus aureus* appare come un piccolo alone di emolisi pronunciata che si estende solo per 2 mm circa dal ceppo da testare, all'interno dell'alone debolmente emolitico dello *Staphylococcus aureus*.

API Listeria: viene eseguita per confermare ed identificare il patogeno. Eseguito secondo le istruzioni fornite dal kit (ditta BIOMERIEUX).

### 5.5.2. Determinazione quantitativa Carica Mesofila Totale

La numerazione della carica Mesofila Totale è stata eseguita secondo procedura trascritta dall'elaborazione della norma ISO 4833:2003  
Il seguente diagramma sintetizza la procedura applicata, derivata dalla norma sopra citata



Esecuzione dell'analisi:

L'analisi è basata sulla conta delle colonie in piastra con terreno Plate Count Agar secondo la tecnica dell'agar germi dopo incubazione aerobia a 30°C per 72h.

- Preparare la sospensione iniziale omogeneizzando 20 g di alimento in 180 ml di ST (Soluzione Triptone - LABM) utilizzato per la preparazione del campione; allestire le eventuali diluizioni (dalla 10<sup>-1</sup> alla 10<sup>-8</sup>) e porre 1 ml di ogni diluizione in ciascuna piastra.

- Versare da 12-15 ml circa di terreno PCA (Plate Count Agar - BIOLIFE) fuso, mantenuto a 44-47°C, in ciascuna piastra, disperdere omogeneamente l'inoculo mediante movimenti ondulatori e lasciare solidificare su superficie fresca e orizzontale.

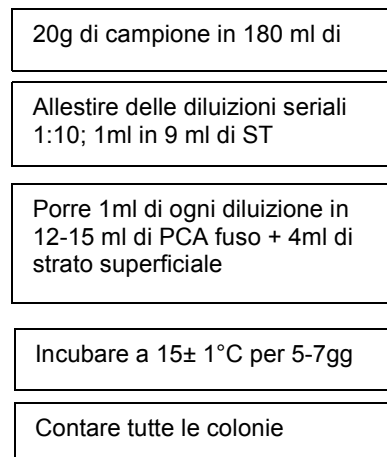
- Incubare le piastre in posizione capovolta, in pile di massimo sei piastre, distanti tra loro almeno 25 mm, a 30 ± 1°C per 72 ± 3 h.

- Procedere con l'identificazione di tutte le colonie presenti, comprese le colonie puntiformi, ma è essenziale che l'operatore non le confonda con frustoli derivanti dal campione. Colonie diffuse devono essere considerate singole colonie. Prendere in considerazione tutte le piastre contenenti un massimo di 300 colonie di germi.

### 5.5.3. Determinazione quantitativa Carica Psicrotrofa Totale

La numerazione della carica Psicrofila Totale è stata eseguita secondo procedura trascritta dall'elaborazione della norma ISO 7218:2007

Il seguente diagramma sintetizza la procedura applicata, derivata dalla norma sopra citata



#### Esecuzione dell'analisi:

L'analisi è basata sulla conta delle colonie in piastra con terreno Plate Count Agar secondo la tecnica dell'agar germi dopo incubazione aerobia a 15°C per 5-7 giorni.

- Preparare la sospensione iniziale omogeneizzando 20 g di alimento in 180 ml di ST (Soluzione Triptone - LABM) utilizzato per la preparazione del campione; allestire le eventuali diluizioni (dalla 10<sup>-1</sup> alla 10<sup>-8</sup>) e porre 1 ml di ogni diluizione in ciascuna piastra.

- Versare da 12-15 ml circa di terreno PCA (Plate Count Agar - BIOLIFE) fuso, mantenuto a 44-47°C, in ciascuna piastra, disperdere omogeneamente l'inoculo mediante movimenti ondulatori e lasciare solidificare su superficie fresca e orizzontale. Aggiungere 4ml di PCA come strato superficiale;

- Incubare le piastre in posizione capovolta, in pile di massimo sei piastre, distanti tra loro almeno 25 mm, a 15 ± 1°C per 5-7giorni.

- Procedere con l'identificazione di tutte le colonie presenti, comprese le colonie puntiformi, ma è essenziale che l'operatore non le confonda con frustoli derivanti dal campione. Colonie diffuse devono essere considerate singole colonie. Prendere in considerazione tutte le piastre contenenti un massimo di 300 colonie di germi.

#### 5.5.4. Determinazione quantitativa batteri lattici

La numerazione dei Batteri Lattici a 30°C è eseguita secondo procedura trascritta dall'elaborazione della norma ISO 7218:2007

Il seguente diagramma sintetizza la procedura applicata, derivata dalla norma sopra citate.



#### Esecuzione dell'analisi:

L'analisi è basata sulla conta delle colonie caratteristiche di batteri lattici in piastre di terreno specifico MRSbl, secondo la tecnica dell'agar germi dopo incubazione a 30 °C per 72 h in microaerofilia.

- La presente procedura si applica per la ricerca di batteri lattici quali *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*. Si definiscono Batteri Lattici, quei batteri che formano colonie caratteristiche a 30°C in terreno MRSbl (BIOLIFE).

- Preparare la sospensione iniziale omogeneizzando 20 g di alimento in 180 ml di ST (Soluzione Triptone - LABM) utilizzato per la preparazione del campione; allestire le eventuali diluizioni (dalla 10<sup>-1</sup> alla 10<sup>-8</sup>) e porre 1 ml di ogni diluizione in ciascuna piastra. Ogni diluizione viene eseguita in doppio.

- Versare 12-15 ml circa di MRSbl fuso e mantenuto a 44-47°C in ciascuna piastra, disperdere omogeneamente l'inoculo mediante movimenti ondulatori e lasciare solidificare su superficie fresca e orizzontale. Quando il terreno è solidificato, versare sulla superficie un secondo strato di terreno (circa 3 ml).

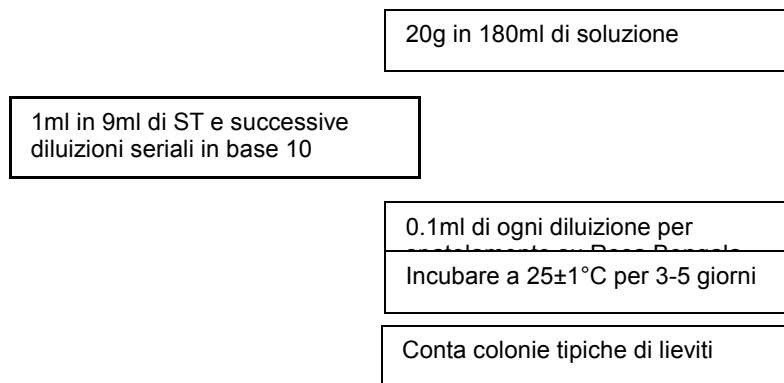
- Incubare le piastre in posizione capovolta, in pile di massimo sei piastre, distanti tra loro almeno 25 mm, a 30 ± 1°C per 72 ± 3 h.

- Procedere con la conta delle colonie caratteristiche (colonie compatte o con aspetto piumoso piccole, opache e bianche). Prendere in considerazione tutte le piastre contenenti un massimo di 150 colonie di germi.

### 5.5.5. Determinazione lieviti

La numerazione di lieviti è eseguita secondo procedura trascritta dall'elaborazione della norma ISO 7218:2007

Il seguente diagramma sintetizza la procedura applicata, derivata dalla norma sopra citate.



#### Esecuzione dell'analisi:

L'analisi è basata sulla conta delle colonie in piastra con terreno di RBCA secondo la tecnica della semina in superficie dopo incubazione aerobia a 25°C per 3-4 giorni.

- Predisporre sul banco di lavoro una piastra di RBCA per ciascuna delle diluizioni da seminare.
- Svolgere le operazioni in prossimità della fiamma bunsen per evitare di contaminare i risultati.
- Utilizzando una pipetta sterile, versare nel centro della piastra di terreno 0.1ml di campione liquido. Procedere versando 0.1 ml delle appropriate diluizioni nel centro di ciascuna piastra di terreno con pipetta sterile. Spatolare uniformemente.
- Incubare in posizione capovolta in pile a 25± 1°C per 3-4 giorni.
- procedere alla lettura delle piastre mediante conta diretta delle colonie caratteristiche di lieviti. Tali colonie appaiono di un colore rosa, cremose,molli.
- Prendere in considerazione le piastre contenenti al massimo 150 colonie.

I valori ottenuti da questi metodi di analisi sono stati trasformati in gradi logaritmici per una migliore comprensione dei risultati.

### **5.5.6. Determinazione acqua libera**

La determinazione dell'Aw negli alimenti avviene secondo il Decreto 16 dicembre 1993; è un parametro utilizzato per valutare la quantità di acqua libera presente nel prodotto e stabilire se l'alimento favorisce o meno la crescita di *Listeria monocytogenes*, ai sensi di quanto previsto dal regolamento (CE) 2073/2005. La misurazione è eseguita con un apposito strumento: il misuratore Aw Aqualab modello CX2. La procedura implica la taratura dello strumento prima di iniziare a lavorare, con NaCl 6 M o KCl 0,5 M. Il risultato viene espresso a tre cifre decimali.

Vengono eseguite tre misurazioni per ogni prelievo eseguito in punti diversi al fine di rendere più omogeneo e rappresentativo il risultato.

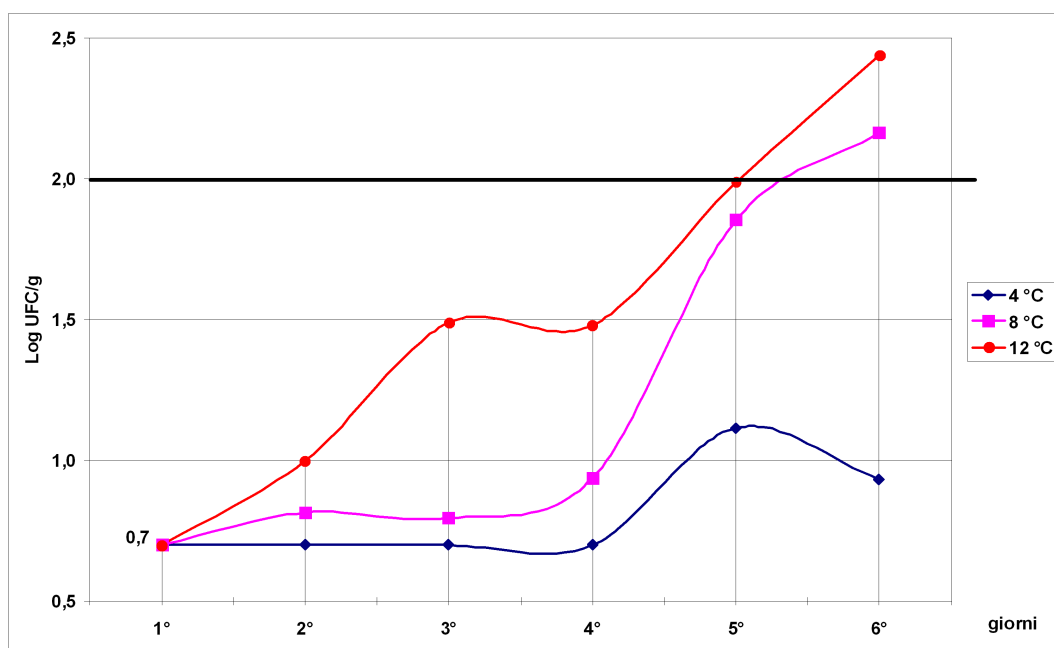
### **5.5.7. Determinazione del pH**

La determinazione del pH negli alimenti avviene secondo il Decreto 16 dicembre 1993; è un parametro utilizzato per valutarne il grado di acidità - basicità del prodotto, al fine di stabilire se l'alimento favorisce o meno la crescita di *Listeria monocytogenes*, ai sensi di quanto previsto dal regolamento (CE) n. 2073/2005. La misurazione è stata eseguita con pHmetro Crison modello GLP 21. La procedura implica la taratura dello strumento prima di iniziare a lavorare, con apposite soluzioni tampone a pH 4,01 e pH 7,00; risciacquo con acqua distillata. Il risultato in unità di pH viene espresso riportando il valore del pH letto dallo strumento con una cifra decimale. La seconda cifra viene arrotondata per eccesso o difetto. Vengono eseguite tre misurazioni per ogni prelievo eseguito in punti diversi al fine di rendere più omogeneo e rappresentativo il risultato.

## 6. RISULTATI

### 6.1. Contaminazione con un inoculo <10 UFC/g

I risultati relativi alla dinamica dello sviluppo di *L. monocytogenes* rispettivamente nel cocco e nel melone conservati per 6 giorni a temperatura di 4°C, 8°C e 12°C sono riassunti nel grafico 1a e 1b. Le curve di crescita riportate nel grafico corrispondono al valore medio tra tutte le prove di contaminazione effettuate.

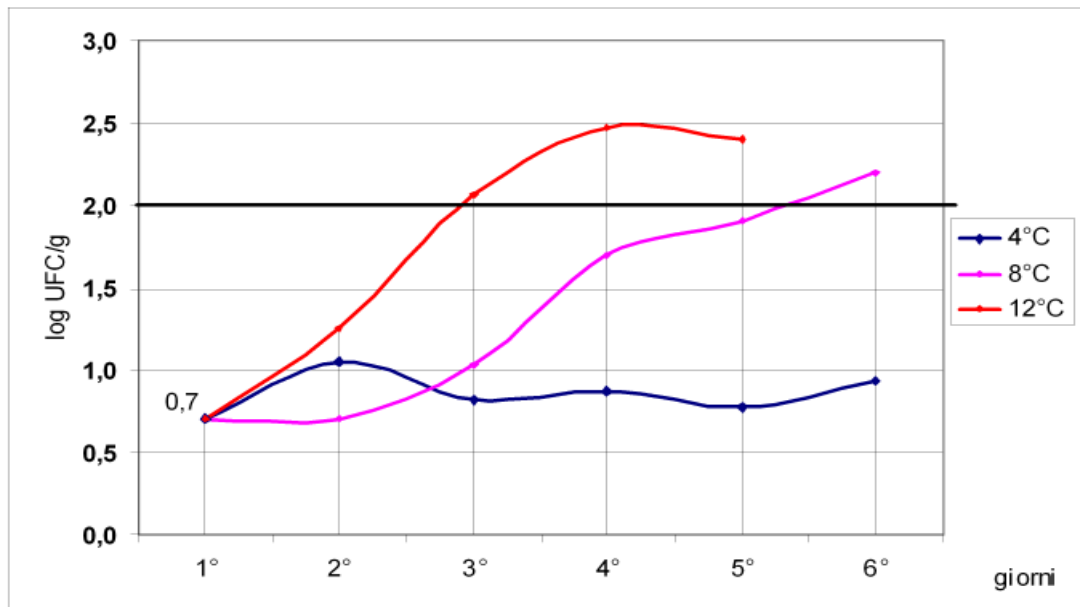


**Grafico 1 a.** Andamento delle cariche di *Listeria monocytogenes* in cocco contaminato con carica <10 UFC/g. Valori medi dei 6 lotti in esame conservati a 3 temperature diverse.

Come si osserva dal grafico la quantità di *L. monocytogenes* in cocco, che parte da una carica microbica di 0,7 log UFC/g, si modifica alle varie temperature nel seguente modo:

- a 4°C nell'arco dei 6 giorni non arriva a superare il limite;
- a 8°C il limite viene superato tra il 5° e 6° giorno;
- a 12°C si supera il limite tra il 5° giorno.





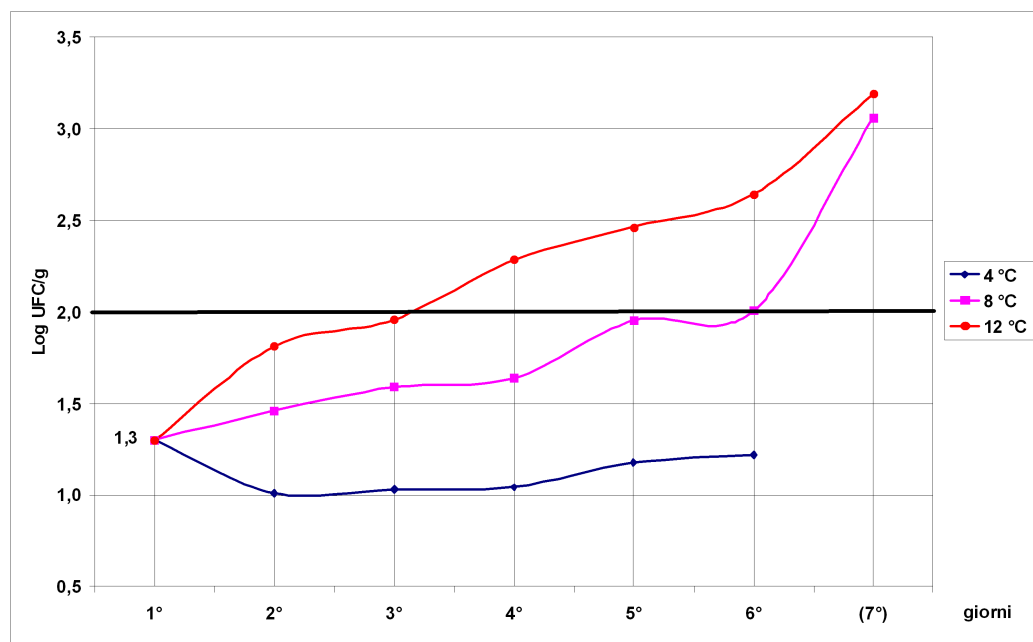
**Grafico 1 b.** Andamento delle cariche di *Listeria monocytogenes* in melone contaminato con carica  $<10 \text{ UFC/g}$ . Valori medi dei 6 lotti in esame conservati a 3 temperature diverse.

Come si osserva dal grafico nel melone la quantità di *L. monocytogenes*, che parte da una carica microbica di  $0,7 \log \text{UFC/g}$ , si modifica alle varie temperature nel seguente modo:

- a  $4^\circ\text{C}$  nell'arco dei 6 giorni non arriva a superare il limite;
- a  $8^\circ\text{C}$  il limite viene superato tra il 5° e 6° giorno;
- a  $12^\circ\text{C}$  si supera il limite tra il 2° e 3° giorno.

## 6.2. Contaminazione con un inoculo 10 UFC/g

I risultati relativi alla dinamica dello sviluppo di *L.monocytogenes* rispettivamente nel cocco e nel melone conservati per 6 giorni a temperatura di 4°C, 8°C e 12°C sono riassunti nel grafico 2 a e 2b. Le curve di crescita riportate nel grafico corrispondono al valore medio tra tutte le prove di contaminazione effettuate.

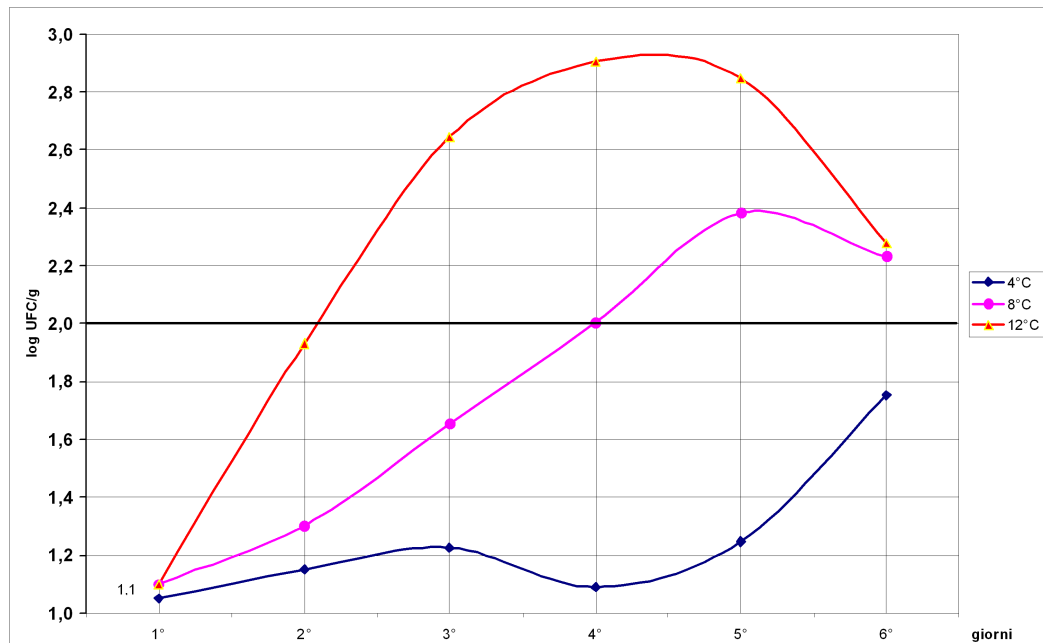


**Grafico 2 a.** Andamento di *Listeria monocytogenes* in cocco contaminato con carica 10 UFC/g.

Valori medi dei 6 lotti in esame conservati a 3 temperature diverse.

Come si osserva dal grafico nel cocco la quantità di *L. monocytogenes*, che parte da una carica microbica di 1,3 log UFC/g corrispondente al valore di 13 UFC/g, si modifica alle varie temperature nel seguente modo:

- a 4°C nell'arco dei 6 giorni non supera mai il limite di 2 gradi logaritmici;
- a 8°C il limite viene superato al 6° giorno;
- a 12°C si supera il limite tre il 3° e il 4° giorno.



**Grafico 2b.** Andamento di *Listeria monocytogenes* in melone contaminato con carica 10 UFC/g. Valori medi dei 6 lotti in esame conservati a 3 temperature diverse.

Come si osserva dal grafico nel cocco la quantità di *L. monocytogenes*, che parte da una carica microbica di 1,1 log UFC/g, si modifica alle varie temperature nel seguente modo:

- a 4°C nell'arco dei 6 giorni non supera mai il limite di 2 gradi logaritmici;
- a 8°C il limite viene superato al 4° giorno;
- a 12°C si supera il limite tre il 2° e il 3° giorno.

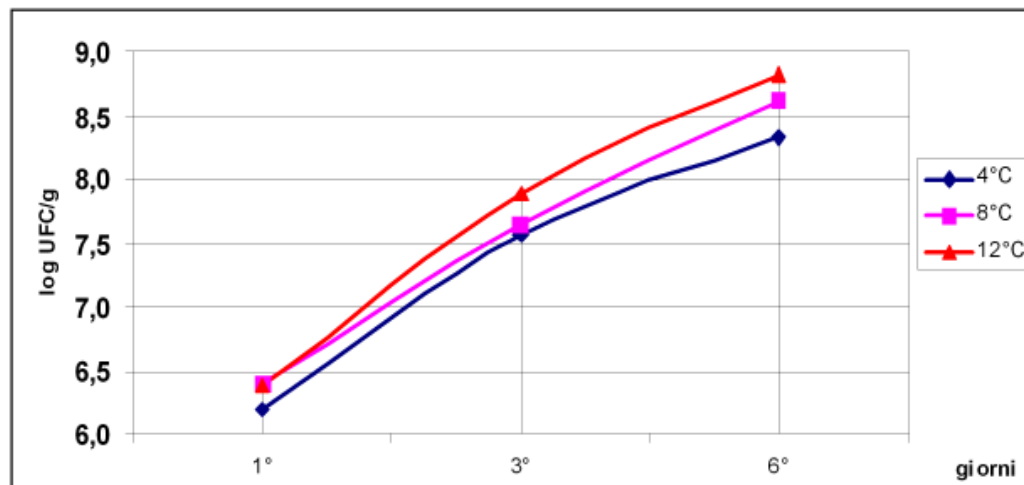
Si nota, inoltre, che la quantità di *L. monocytogenes*, presente nel primo giorno di analisi, sia per il cocco che per il melone, è leggermente superiore a quella che si pensava di aver inoculato. Questo può essere dovuto al fatto che per le analisi venivano prelevati 10 g di prodotto dalla vaschetta contenente in totale 30 g. Quindi, è possibile che si sia verificata una non uniforme distribuzione del patogeno al momento dell'inoculo, con variazioni di cariche in punti ravvicinati.

### 6.3. Andamento della carica batterica totale

Di seguito sono riportati solo i grafici delle cariche batteriche in frutta con inoculo di 10 UFC/g di *L. monocytogenes* in quanto i risultati ottenuti sono analoghi a quelli con inoculo inferiore a 10 UFC/g.

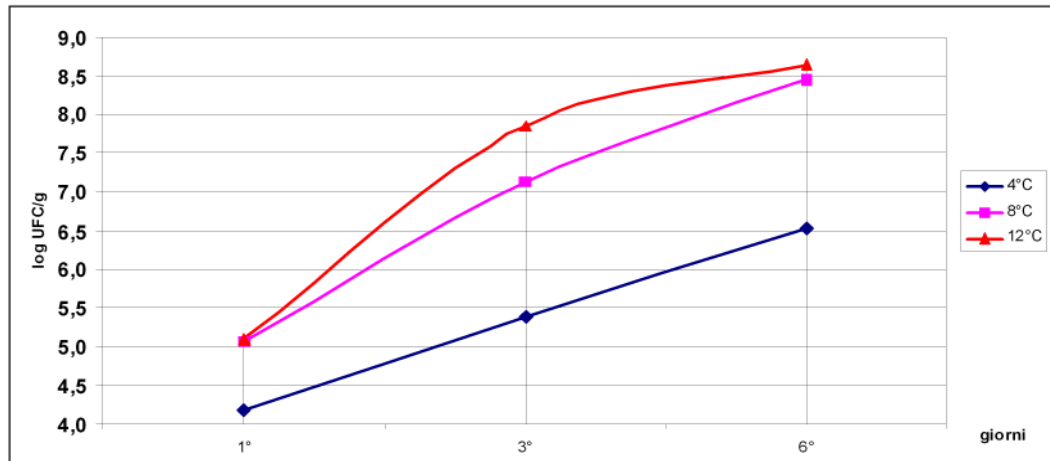
#### 6.3.1. Andamento di carica mesofila totale

I risultati relativi alla dinamica della carica mesofila totale rispettivamente nel cocco e nel melone conservati per 6 giorni a temperatura di 4°C, 8°C e 12°C sono riassunti nel grafico 3a e 3b. Le curve di crescita riportate nel grafico corrispondono al valore medio tra tutte le prove di contaminazione effettuate.



**Grafico 3a.** Andamento della carica batterica mesofila in cocco. Valori medi dei 6 lotti in esame conservati a 3 temperature diverse.

Come si può notare a tutte e tre le temperature si registrano valori molto simili. Nel primo giorno si misura una carica di 6,4 che aumenta a valori compresi tra 8,4 e 8,7 gradi logaritmici al sesto giorno.



**Grafico 3b.** Andamento delle cariche batterica mesofila in melone contaminato con carica <10 UFC/g. Valori medi dei 6 lotti in esame conservati a 3 temperature diverse.

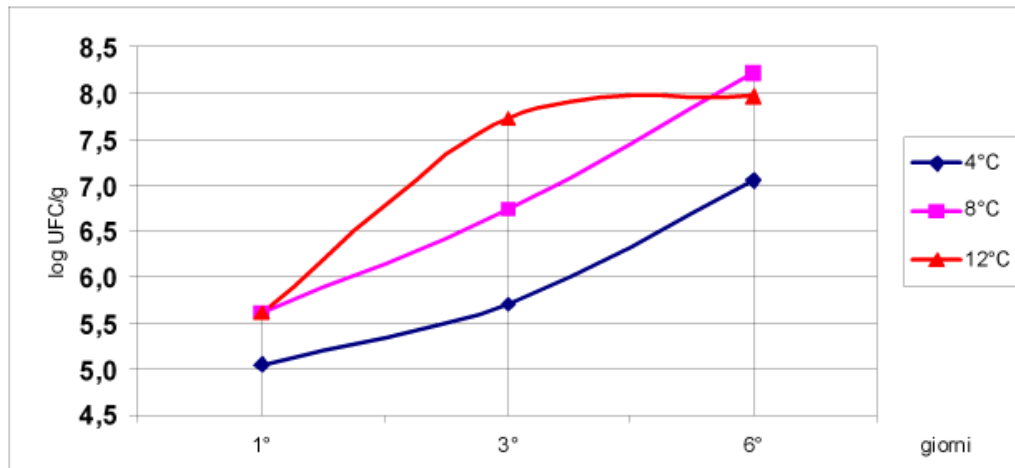
Si osserva che per il melone si ottengono valori simili per le temperature di 8 e 12°C dove dal primo al sesto giorno si registra un aumento di 3,5 gradi logaritmici.

Alla temperatura di 4°C, invece si osserva una partenza più bassa che è dovuta alla mancanza dell'analisi sull'ultimo lotto. Tuttavia quello che si può rilevare è un aumento di un paio di gradi logaritmici.

Sia per il melone che per il cocco i grafici della carica psicrotrofa totale sono risultati analoghi a quelli della carica mesofila per tale ragione è stato deciso di tralasciarli.

### 6.3.2. Andamento dei batteri lattici

I risultati relativi alla dinamica dei batteri lattici rispettivamente nel cocco e nel melone conservati per 6 giorni a temperatura di 4, 8 e 12°C sono riassunti nel grafico 4a e 4b. Le curve di crescita riportate nel grafico corrispondono al valore medio tra tutte le prove di contaminazione effettuate.

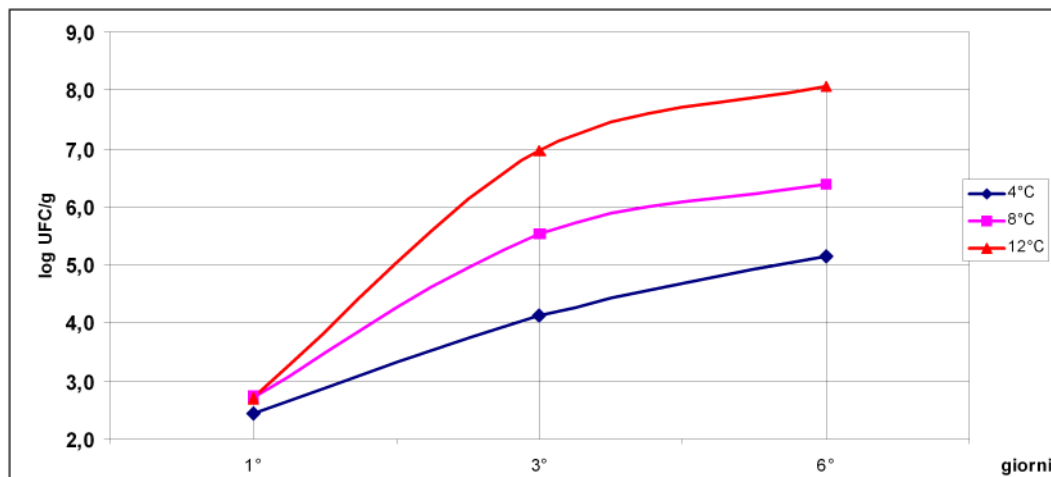


**Grafico 4a.** Andamento dei batteri lattici in cocco. Valori medi dei 6 lotti in esame conservati a 3 temperature diverse.

Al 1° giorno i batteri lattici presentano cariche di 5,6 log UFC/g per le vaschette destinate alle temperature di 8 e 12°C; mentre quella per la conservazione a 4°C ha fatto registrare un valore di poco inferiore (5,0 log UFC/g). Tale ultimo risultato è spiegabile in quanto in un lotto non fu eseguita la ricerca del parametro analitico.

Nei giorni successivi aumenta repentinamente per i prodotti messi a 12°C e al sesto giorno si stabilizza attorno ad un valore di 8,0.

Alle temperature di 4°C e 8°C si nota un aumento graduale nel tempo.



**Grafico 4b.** Andamento dei batteri lattici in melone. Valori medi dei 6 lotti in esame conservati a 3 temperature diverse.

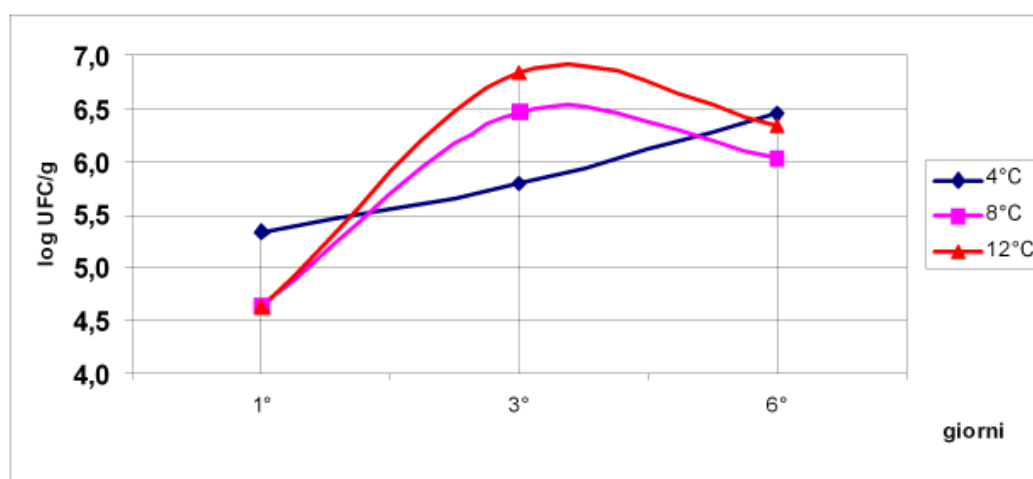
In questo caso, come si può notare nel grafico, la partenza è praticamente sovrapponibile per tutte e 3 le vaschette (2,8 log UFC/g); poi, nei giorni successivi invece la carica si differenzia in maniera proporzionale alla rispettiva temperatura di conservazione.

Dal grafico di cocco si può notare come la crescita dei batteri lattici sia più repentina fino al terzo giorno e poi si stabilizza. Il melone mostra, invece, un aumento graduale.

### 6.3.3. Andamento dei lieviti

I risultati relativi alla dinamica dei lieviti rispettivamente nel cocco e nel melone conservati per 6 giorni a temperatura di 4°C, 8°C e 12°C sono riassunti nel grafico 5a e 5b.

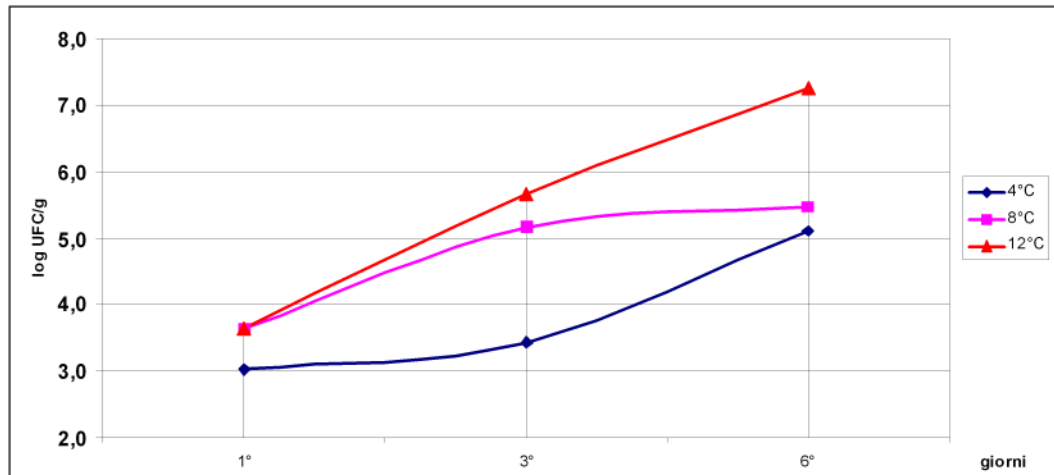
Le curve di crescita riportate nel grafico corrispondono al valore medio tra tutte le prove di contaminazione effettuate.



**Grafico 5a.** Andamento dei lieviti in cocco. Valori medi dei 6 lotti in esame conservati a 3 temperature diverse.

Per il cocco si osserva:

- a 4°C il primo giorno si parte già con una carica più elevata (5,4 log UFC/g) rispetto alle altre temperature in quanto per un lotto non è stata eseguita la ricerca del parametro analitico. ;
- a 8°C si passa da una carica di 4,6 ad una di 6,0 log UFC/g;
- a 12°C si passa da una carica di 4,6 ad una di 6,4 log UFC/g.



**Grafico 5b.** Andamento dei lieviti in melone. Valori medi dei 6 lotti in esame conservati a 3 temperature diverse.

Per il melone si osserva:

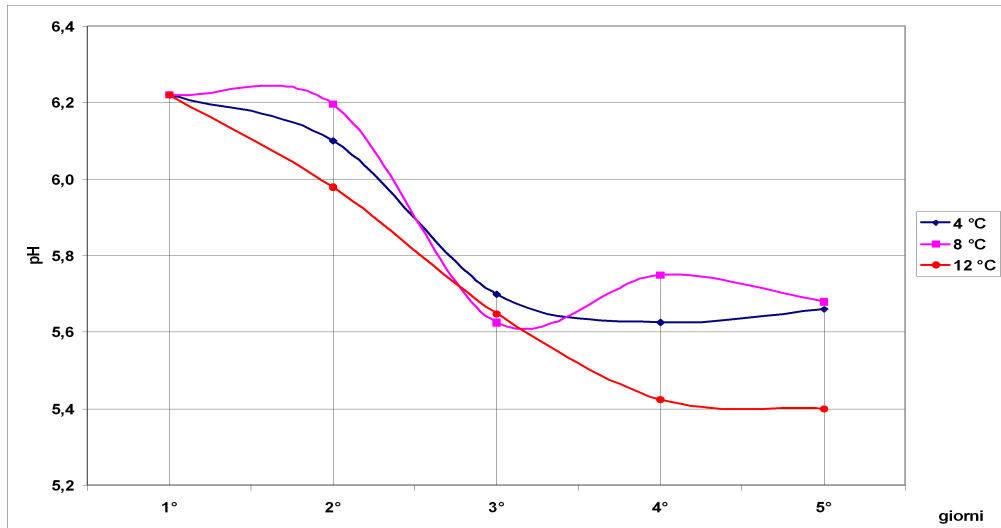
- a 4°C: si passa da un valore di 3,0 log a 5,7 UFC/g;
- a 8°C: si passa da un valore di 3,8 a 5,7 log UFC/g;
- a 12°C: si passa da un valore di 3,8 a 7,3 log UFC/g.

#### 6.3.4. Andamento del pH in frutta contaminata con quantità inferiore a 10 UFC/g

I risultati relativi alla dinamica dei lieviti rispettivamente nel cocco e nel melone conservati per 6 giorni a temperatura di 4°C, 8°C e 12°C sono riassunti nel grafico 6 a e 6b.

Le curve di crescita riportate nel grafico corrispondono al valore medio tra tutte le prove di contaminazione effettuate.



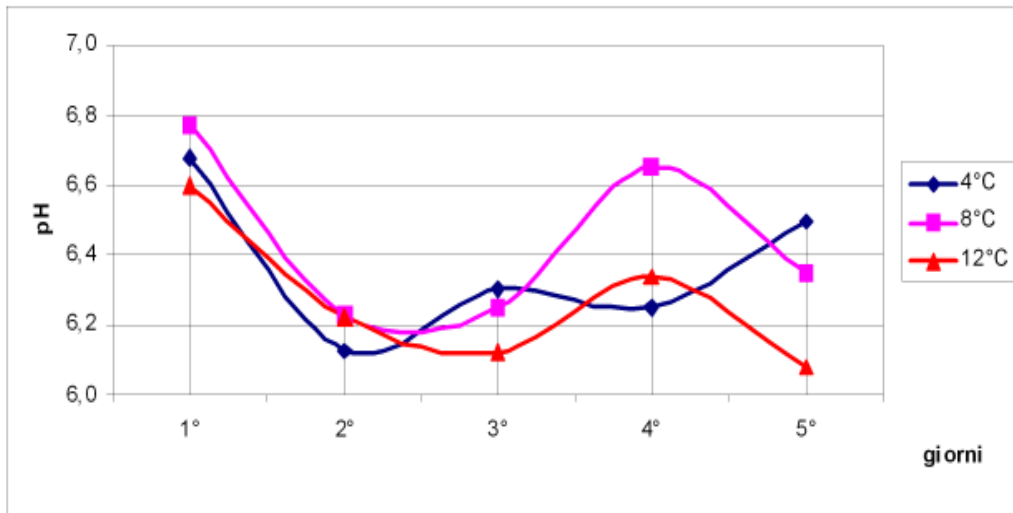


**Grafico 6a.** Andamento del pH in cocco. Valori medi dei 6 lotti in esame conservati a 3 temperature diverse.

Si osserva un notevole abbassamento del pH:

- 4°C: da 6.2 a 5.7;
- 8°C da 6.2 a 5.7;
- 12°C da 6.2 a 5.4.

Il maggior calo di pH si verifica a temperatura di 12°C.



**Grafico 6b.** Andamento del pH in melone contaminato con carica inferiore a 10 UFC/g. Valori medi dei 6 lotti in esame conservati a 3 temperature diverse.

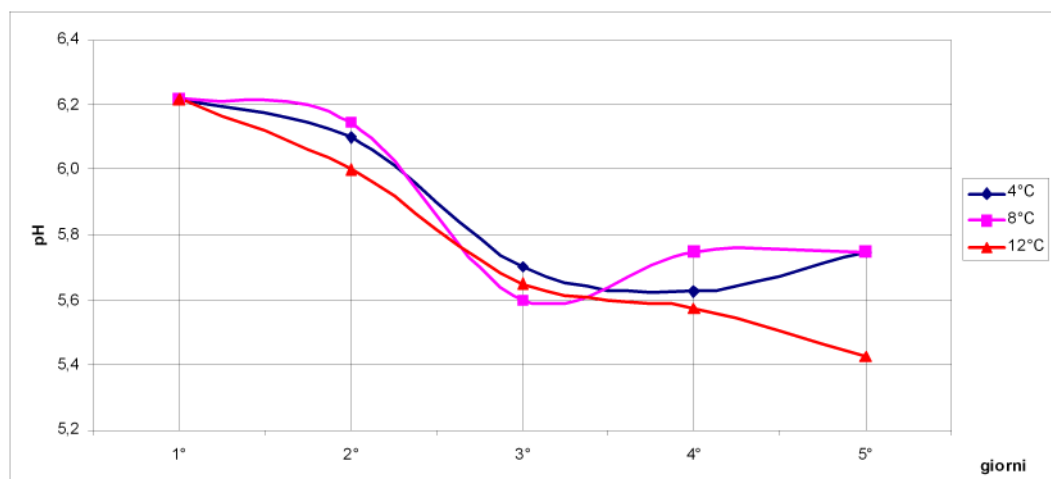
Il valore del pH al primo giorno è leggermente diverso per le tre temperature e varia tra 6.6 e 6.8.

In generale si verifica un abbassamento del pH sempre con andamento incostante.

### 6.3.5. Andamento del pH in frutta contaminata con quantità di 10 UFC/g

I risultati relativi alla dinamica dei lieviti rispettivamente nel cocco e nel melone conservati per 6 giorni a temperatura di 4°C, 8°C e 12°C sono riassunti nel grafico 7a e 7b.

Le curve di crescita riportate nel grafico corrispondono al valore medio tra tutte le prove di contaminazione effettuate.

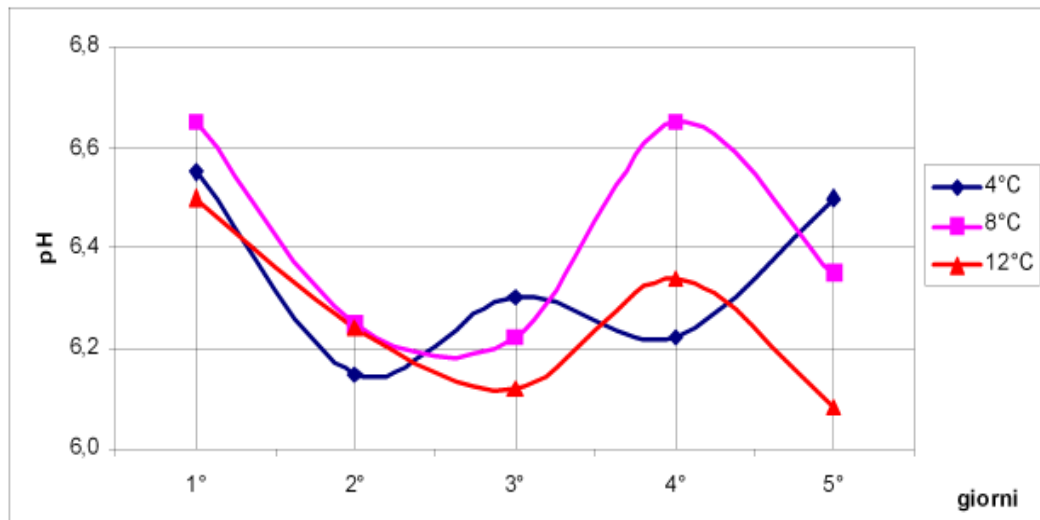


**Grafico 7a.** Andamento del pH in cocco contaminato con carica di 10 UFC/g. Valori medi dei 6 lotti in esame conservati a 3 temperature diverse.

Si osserva un evidente abbassamento del pH:

- 4°C: da 6.2 a 5.7;
- 8°C da 6.2 a 5.7;
- 12°C da 6.2 a 5.4.

Il calo maggiore si registra a temperatura di 12°C.



**Grafico 7b.** Andamento del pH in melone contaminato con carica di 10 UFC/g. Valori medi dei 6 lotti in esame conservati a 3 temperature diverse.

Anche qua si registra per il melone un andamento incostante dovuto alla difficoltà di misurare il pH su questa matrice alimentare. Si osserva comunque complessivamente un suo abbassamento più evidente, soprattutto, a temperatura di 12°C.

Non vengono presi in considerazione i grafici sull' $A_w$  in quanto essa non si modifica ma resta pressoché costante: infatti, per entrambi i frutti, essa risulta compresa tra i valori di 0.980 - 0.999 per tutto il periodo di conservazione delle vaschette e a tutte le temperature utilizzate.

## 7. CONSIDERAZIONI

Come è stato descritto, la frutta di IV gamma considerata in questo tipo di sperimentazione è quella che rappresenta una matrice più favorevole alla proliferazione di *L. monocytogenes*.

Quello che è emerso dai dati ottenuti può essere così esemplificato:

- l'inoculo con *L. monocytogenes* effettuato con cariche inferiori a 10 UFC/g ha mostrato che il melone sembra essere la matrice favorente maggiormente la proliferazione di *Listeria monocytogenes*. Infatti, nelle vaschette poste a 12°C i risultati ottenuti evidenziano che il limite di 2 log UFC/g viene superato al 5° giorno nel cocco e tra il 2° e il 3° giorno nel melone;
- inoculando una carica superiore (10 UFC/g) per il cocco a 12°C viene superato il limite tra il 3° e il 4° giorno; a 8°C per il melone il 4° giorno;
- all'aumentare della quantità inoculata, sia a 12 che a 8°C, si verifica il superamento del limite più rapidamente;
- la conservazione delle vaschette a 4°C in tutti i casi non ha mai permesso al patogeno di crescere fino a raggiungere le cariche superiori al limite previsto dalla normativa;
- il pH non sembra influire sulla dinamica di *L. monocytogenes* in quanto il suo valore è vero che scende ma non tanto da essere inibente per il batterio (valore minimo raggiunto 5.7 con conservazione a 12°C);
- analogamente anche l' $A_w$  non influisce più di tanto, in quanto è noto che i batteri alteranti in genere sono parzialmente inibiti quando si scende sotto valori di 0,97 e per *L. monocytogenes* è necessario scendere sotto 0,92;
- la crescita dei batteri lattici è chiaramente più marcata a 12°C per entrambi i frutti con il raggiungimento alla scadenza del prodotto di circa 8 gradi logaritmici. Essi possono avere un effetto inibente nei confronti di *Listeria monocytogenes* per la produzione di batteriocine, importanti molecole che inibiscono la crescita di altri batteri Gram positivi. In questo specifico caso tuttavia la shelf-life troppo breve del prodotto probabilmente non ha permesso la produzione delle batteriocine infatti non si nota l'effetto di inibizione;
- i lieviti possono essere microrganismi sia mesofili che psicrotrofi. Quelli che crescono di più nei prodotti di IV gamma probabilmente sono i secondi in quanto si verifica dai grafici che aumentano di numero in maniera più marcata alla temperatura di 12°C.

quindi a influire su tutto sembrerebbe essere sola la temperatura

## 8. CONCLUSIONI

I risultati riportati in questo lavoro di tesi rappresentano ciò che si è ottenuto dallo studio preliminare della dinamica di *Listeria monocytogenes* in frutta di IV gamma. Sono in corso ulteriori sperimentazioni che permetteranno di andare a fondo sulle problematiche di questo prodotto alimentare il cui consumo, come riportato nell'introduzione, sembra in continuo aumento.

Si può evincere che:

- se il prodotto di IV gamma viene conservato alla temperatura di refrigerazione stabilità e precisamente a una temperatura non superiore a 4°C, *Listeria monocytogenes* non supererà mai il limite consentito di 100 UFC/g come dimostrano le prove di inoculazione sperimentale effettuate;
- per i campioni conservati in condizioni di abuso termico, indipendentemente dalla carica iniziale di contaminazione, lo sviluppo del patogeno appare più marcato, particolarmente per il melone, ed il limite di legge è stato superato entro la scadenza del prodotto in tutte le prove.
- l'aumento della quantità di *Listeria* è correlata principalmente con gli abusi delle temperatura di refrigerazione mentre la carica microbica nel prodotto (carica mesofila e psicrotrofa totale) non sembra essere in competizione con la crescita del patogeno.

Da questa sperimentazione emerge chiaramente che, per prevenire la contaminazione del prodotto, è necessario applicare le buone pratiche di lavorazione (GMP) in fase di produzione, come enunciato anche dalle normative in vigore appartenenti al "pacchetto igiene", dove sono riportati e sottolineati i seguenti requisiti:

- l'igiene del personale e la sua corretta istruzione,
- il rispetto delle temperature di conservazione degli alimenti,
- lo stato igienico delle superfici di lavorazione, degli utensili e delle attrezzature raggiunto da appropriati interventi di detersione e sanificazione.

La catena del freddo è di fondamentale importanza al fine di garantire la sicurezza e la qualità della frutta di IV gamma. Il principale strumento a disposizione è il monitoraggio continuo della temperatura in ogni punto della catena. Bisogna quindi evitare:

- la continua apertura dei cassettoni refrigerati degli automezzi,
- attese prolungate dei bancali scaricati fuori dalle celle,
- abbandono al di fuori dei banchi frigoriferi per troppo tempo;
- non corretta calibrazione dei termometri delle celle e/o dei banchi

frigoriferi.

Tutto questo potrebbe contribuire alla proliferazione di *Listeria monocytogenes* che se presente a causa di una contaminazione

accidentale durante il processo di lavorazione, potrebbe proliferare in modo incontrollato.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Abadias M., Usall J., Anguera M., Solsona C., Viñas I. (2007), “Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments”. *Int. J. Food Microbiol.*, 123 (2008), 121–129.
- Farber J.M., Peterkin P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*: A food borne pathogen. *Microbiol. Rev.*, 55: 476-511.
- Galli Volonterio A. (2005) *Microbiologia degli alimenti*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
- Gianfranceschi M., Gattuso A., D’Ottavio MC., Fokas S., Aureli P. (2007), Results of a 12-month long enhanced surveillance of listeriosis in Italy. *Euro Surveill*, vol. 12
- Khelef N., Lecuit M., Buchrieser C., Cabanes D.,(2006).*Listeria monocytogenes* and the Genus *Listeria*. Ed Springer New York
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). (1996). *Microorganisms in Foods 5 – Microbiological Characteristics of Food Pathogens*. Blackie Academic & Professional.
- Mioni R., Comin D., Fornasiero E., Grimaldi M., Bordin P., (2008). *Indagine preliminare sulla dinamica di Listeria monocytogenes in frutta della IV gamma*. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD).
- Murray E.G.D., Webb A.A., Swann M.B.R. (1926), “ A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus bacterium monocytogenes n. sp”. *J. of Path. And Bacter.*, 29, p.407-439.
- Report of the Scientific Committee on Food (2002), “Risk Profile on the Microbiological Contamination of Fruits and Vegetables Eaten

Raw". *EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL*

- Rocourt j., BenEmbarek P., Toyofuku H., Schlundt J. (2003), "Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach". *FEMS Immunology & Medical Microbiology*
- Rondanelli E.G., Fabbi M., Marone P. *Trattato sulle infezioni e tossinfezioni alimentari*. Edizione Selecta medica, 2005.
- Schlech WF 3rd, Lavigne PM, Bortolussi RA, Allen AC, Haldane EV, Wort AJ, Hightower AW, Johnson SE, King SH, Nicholls ES, Broome CV. (1983), "Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food.". *N Engl J Med*. 1983 Jan 27;308(4):203-6
- Porretta S. (2008). *Shelf Life degli alimenti - Meccanismi Valutazione Previsione*. Ed Chiriotti editori.
- Sinigaglia M., Bevilacqua A., Campaniello D., D'Amato D., Corbo MR. (aprile 2006), "Growth of *Listeria monocytogenes* in fresh-cut coconut as affected by storage conditions and inoculum size". *Journal of food Protection*, Vol. 69, No 4, 2006, Pages 820-825.
- Virginia N., Scott-1, Katherine M., Swanson-2 J., Timothy A., Freier-3, W. Payton Pruett, Jr.-4, William H. Sveum-5, Paul A. Hall-6, Leslie A. Smoot-7, and Daniel G, (November 2005), "Guidelines for Conducting *Listeria monocytogenes* Challenge Testing of Foods". *Food Protection Trends*, Vol. 25, No. 11, Pages 818–825.

### 9.1 Citazioni di sitografia

- http 1: [www.izsve.it](http://www.izsve.it)
- http 2: [www.food-info.net](http://www.food-info.net)
- http 3: [www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov)
- http 4: <http://www.dh-hiross.com/pdf/docs/N2.pdf>.

## 9.2. Citazioni normative

Decreto 16 dicembre 1993. "Individuazione delle sostanze alimentari deteriorabili alle quali si applica il regime di controlli microbiologici ufficiali". (G.U. 28/12/93 n. 303)

ISO 7218 (2007), " *Microbiology of food and animal feeding stuffs- General rules for microbiological examination*"

ISO 4833:2003, " *Microbiology of food and animal feeding stuffs\_Horizontal method for the enumeration of microorganism – Colony count technique at 30°C*"

ISO 11290-2 (1998), " *Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes*". Part 2: enumeration medium.

Legge n. 283, 30 aprile 1962-- Modifica degli articoli 242, 243, 247, 250 e 262 del testo unico delle leggi sanitarie, approvato con regio decreto 27 luglio 1934, n. 1265: Disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande.

Decreto del Presidente della Repubblica n° 327 del 26/03/1980  
Regolamento di esecuzione della L. 30 aprile 1962, n.283 , e successive modificazioni, in materia di disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande. (G. U. CE L. 193 del 16/07/1980)

Regolamento CE n. 2073 della Commissione del 15 novembre 2005 su " *Criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari*". (G. U. CE L 338 del 22/12/2005)