



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI AGRARIA**

**CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN
SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI**

TESI DI LAUREA

**VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ
MICROBIOLOGICA DEI PRODOTTI IN
POLVERE PER L'INFANZIA**

RELATORE: CH.MO PROF. CATELLANI PAOLO

LAUREANDA: BENEDETTI MARTINA

ANNO ACCADEMICO 2008-2009

RIASSUNTO	4
SUMMARY	5
1 - INTRODUZIONE.....	6
2 – IL LATTE	7
2.1 – IL MERCATO DEL LATTE.....	7
2.2 – IL LATTE IN POLVERE E PRODOTTI PER L’INFANZIA.....	10
3 - TECNICHE DI CONSERVAZIONE DEGLI ALIMENTI.....	13
3.1 - L’ ESSICCAMENTO	13
3.2 – ATTIVITA’ DELL’ACQUA (A _w)	13
4 - TECNOLOGIA DI PRODUZIONE DEL LATTE IN POLVERE.....	15
4.1 - Istantaneizzazione.....	19
5 - NORME E REGOLAMENTI.....	21
6 – FAMIGLIA ENTEROBACTERIACEAE	24
7 - <i>ENTEROBACTER SAKAZAKII</i>	28
7.1 - CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE	29
7.1.1 - CAPSULA	30
7.1.2 - TEMPI DI DUPLICAZIONE E TERMOTOLLERANZA.....	31
7.1.3 - OSMOTOLLERANZA.....	32
7.1.4 - ANTIBIOTICO RESISTENZA.....	32
7.1.5 - EFFICACIA DEL TRATTAMENTO TERMICO SUI MICRORGANISMI	33
8 - PATOGENESI.....	34
9 - SINTOMATOLOGIA E LESIONI.....	35
10 - EPIDEMIOLOGIA.....	39
11 - VIRULENZA E DOSE INFETTANTE.....	43
12 - METODICHE DI ISOLAMENTO DI <i>E. SAKAZAKII</i> NEGLI ALIMENTI	44

12. 1 - PROCEDURA FDA.....	44
12.2 - METODICA mLSTV/COMPASS	46
12.3 - METODICA CON UV	48
12.4 - METODO DFI	48
12.5 - METODO ESSB/ESIA.....	49
13 - OBIETTIVI DELLA TESI	51
13.1 - MATERIALI E METODI	52
13.1.1 - STUDIO DEL MICRORGANISMO SUI DIVERSI TERRENI DI COLTURA	53
13.1.2 - ANALISI DEI PRODOTTI PER L'INFANZIA	59
13.1.3 - SENSIBILITÀ DELLE PROCEDURE DI RICERCA PER L'ISOLAMENTO DEL MICRORGANISMO.....	68
13.1.4.1- MATERIALI	71
14 - RISULTATI.....	73
14. 1- STUDIO DEL MICRORGANISMO SUI DIVERSI TERRENI DI COLTURA	73
14.2 - ANALISI DEI PRODOTTI PER L'INFANZIA	77
14.4 - INFLUENZA DELLE TEMPERATURE DI RICOSTITUZIONE DEL LATTE IN POLVERE SU E. SAKAZAKII – PROVA PRELIMINARE	84
15 - CONCLUSIONI	86
ALLEGATO 1	SCHEDA TECNICA DI GSP
	103
ALLEGATO 2	SCHEDA TECNICA DI MRS.....
	104
ALLEGATO 3	SCHEDA TECNICA DI OGA.....
	106

RIASSUNTO

Gli alimenti per lattanti in polvere sono destinati a un gruppo di persone a rischio di infezioni di origine alimentare. La polvere di alimenti per lattanti non è sterile e può essere contaminata da diversi agenti patogeni di origine alimentare, quali la *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes* che possono essere veicolo di *Enterobacter sakazakii*.

Enterobacter sakazakii è un Gram negativo, non forma spore ed è un batterio appartenente alla famiglia delle Enterobacteriaceae. Questo patogeno opportunisto è associato a casi sporadici o piccole *outbreaks* di sepsi, meningite e enterocolite necrotizzante soprattutto in neonati e lattanti, con un tasso di mortalità del 40-80%. Il microrganismo è stato recentemente isolato da vari ambienti di trasformazione dei prodotti alimentari, prodotti alimentari, attrezzature ospedaliere, famiglie e anche da insetti.

L'utilizzo di metodiche di laboratorio che siano in grado di individuare anche la presenza di piccole cariche di *E. sakazakii* nell'alimento va associato ad un ampliamento delle conoscenze relative alle caratteristiche del batterio ed alla sua diffusione nell'ambiente e nelle materie prime utilizzate. In questo lavoro si passano in rassegna studi effettuati sulle caratteristiche epidemiologiche, di patogenicità e di resistenza di *E. sakazakii*, con particolare riguardo alle possibilità di sviluppare strategie di controllo del rischio derivante dalla presenza di questo patogeno nel latte formulato in polvere per la prima infanzia.

È stata inoltre valutata la qualità di 47 prodotti in polvere destinati all'infanzia in termini di qualità igienica e sanitaria. Tutte le analisi hanno mostrato una buona qualità di questi prodotti e sono risultate negative tutte le prove relative alla ricerca di microrganismi patogeni.

SUMMARY

Powdered infant formula is utilized for a group of people at risk for food borne infection. The powdered infant formula is not sterile and may be contaminated by several food borne pathogens such as *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes* and it can be vehicle of *Enterobacter sakazakii*.

Enterobacter sakazakii is a gram negative, non spore formed and is a bacterium belonging to the Enterobacteriaceae family. This opportunistic pathogen associated with sporadic cases or small outbreaks of sepsis, meningitis and necrotizing enterocolitis especially neonates and infants, with a mortality rate of 40-80%. The microorganism has been recently isolated from various food processing environments, foods, hospital equipment, households and also from insects.

For these reasons further studies are needed to gain a better understanding of the ecology of the organism and of ways to reduce its levels in reconstituted powdered infant formula.

In this article the available scientific information on *E. sakazakii* is reviewed with special respect to the public health impact determined by this emerging food borne pathogen.

Further are study the hygienic and sanitary quality of 47 product and all the analysed samples shown a good microbiological quality and resulted negative for the presence of investigated food borne pathogens.

1 - INTRODUZIONE

L'allattamento al seno è tuttora considerato, sia dal punto di vista igienico-sanitario che sotto il profilo nutritivo, il metodo più sicuro per l'alimentazione del neonato ed è consigliato fino al sesto mese di vita del bambino.

In Italia, il Ministero della Salute ha emanato una circolare per la tutela e la promozione dell'allattamento al seno (Circolare n. 16 del 24 ottobre 2000) e la Società Italiana di Neonatologia raccomanda l'uso esclusivo del latte materno fino a circa il sesto mese di vita. Dopo tale periodo, però, i neonati hanno bisogno di ricevere, oltre al latte materno, anche prodotti alimentari complementari per soddisfare le crescenti esigenze nutrizionali. Il bambino, in ogni caso, può continuare a ricevere il latte materno fino al secondo anno di vita.

Esistono, tuttavia, situazioni tali da non permettere il ricorso all'allattamento al seno, soggetti nati pre-termine, nati sottopeso (< 2 kg), immunocompromessi e HIV positivi; in questi casi, è necessaria un'appropriata alimentazione di sostituzione costituita da latte formulato (liquido e in polvere), preparato secondo standard riconosciuti in campo internazionale.

L'uso del latte in polvere richiede adeguate conoscenze sulle corrette modalità di preparazione e sui rischi igienici che possono derivare da manipolazione e conservazione impropria, sia a livello domestico sia ospedaliero; infatti, diversamente dal latte formulato liquido, che risulta "sterile" per effetto dei trattamenti termici subiti prima del confezionamento, le formulazioni in polvere hanno una flora microbica residua, composta generalmente da germi saprofiti e da coliformi (o più in generale, da Enterobacteriaceae, batteri considerati non patogeni o opportunisti).

2 – IL LATTE

Il latte prodotto dagli animali da allevamento può essere destinato al consumo diretto oppure alle industrie di trasformazione.

Quello per consumo diretto si trova in commercio sotto varie forme raggruppabili in due categorie: latti naturali, che comprendono latte crudo o latti che hanno subito solo trattamenti necessari a garantire la salubrità e la conservabilità per un tempo più o meno lungo al quale vi appartengono il latte intero pastorizzato, UHT, sterilizzato; latti modificati o speciali, che sono stati sottoposti a processi tali da conferire loro nuove caratteristiche fisico-chimiche, nutrizionali, organolettiche ai quali appartengono: latte scremato, concentrato, in polvere, aromatizzato, latti dietetici (delattosato, vitaminizzato...) latti con fermenti vivi aggiunti, latti fermentati.

2.1 – IL MERCATO DEL LATTE

Per quanto riguarda la produzione di derivati del latte, dopo un 2004 caratterizzato da un calo rilevante della quantità di burro e di latte scremato in polvere, nel 2005 entrambi questi prodotti hanno mostrato una crescita: nell'Unione a 15, infatti, la variazione delle quantità prodotte è per entrambi del 1,8% (tabella 1).

Contribuiscono alla formazione del deficit della bilancia lattiero-casearia italiana, sia in quantità che in valore, tutte le principali categorie.

Nel 2005 la composizione del saldo commerciale in valore evidenzia il ruolo del latte liquido che, con quota del 45,1%, contribuisce largamente alla formazione del deficit. Seguono il latte condensato e in polvere (19,0%), burro e panna (13,9%), yogurt, latti fermentati (11,4%) e formaggi (3,6%) (grafico 1).

Nei nuovi Paesi membri la produzione di latte scremato in polvere è cresciuta in modo decisamente più consistente rispetto all'UE-15.

	PAESI	2001	2002	2003	2004	2005	Var. % 05/04
Latte alimentare	UE 15	29.640	29.504	29.573	29.509	29.409	- 0,3
	UE 25	33.423	33.404	33.518	33.517	33.533	+ 0, 0
Latte e butteroil	UE 15	1.683	1.735	1.716	1.652	1.682	+ 1,8
	UE 25	1.962	2.022	2.009	1.917	1.944	+1,4
Latte scremato in polvere	UE 15	950	1.090	1.051	825	840	+1,8
	UE 25	1.182	1.314	1.292	1.018	1.045	+2,6
Latte intero in polvere	UE 15	834	799	786	781	771	- 1,2
	UE 25	9,27	868	870	865	858	-0,8
Latte condensato	UE 15	1.328	1.236	1.165	1.183	1.138	-3,8
	UE 25	1.212	1.181	-2,6

Tabella 1: produzione di lattiero-caseari nelle latterie della UE, dal 2001 al 2005 (migliaia di ton)

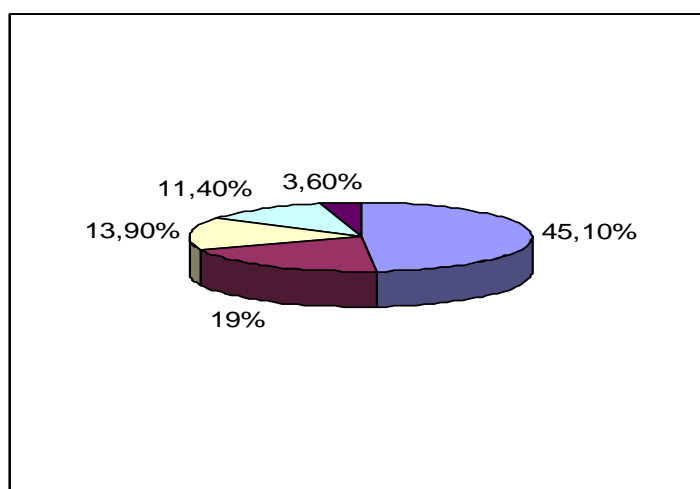


Grafico 1 composizione del deficit lattiero caseario

Sul fronte internazionale di prodotti lattiero-caseari i dati del 2005 confermano che l'allargamento ai nuovi paesi membri abbia portato a un consolidamento della connotazione dell'Unione Europea come uno tra i principali esportatori a livello internazionale (tabella 2).

La Germania è il nostro principale paese di approvvigionamento per il latte scremato in polvere e per quello condensato: in quantità, la sua quota è rispettivamente del 44,1% e 65,7%.

I prodotti lattiero-caseari importati trovano diversi utilizzi, i concentrati del latte costituiscono gli *imput* per l'industria mangimistica e alimentare; il latte liquido rappresenta la materia prima per l'industria del latte alimentare; i formaggi, per la maggior parte, si rivolgono al consumo delle famiglie. Le esportazioni italiane sono per la maggior parte costituite da prodotti ad alto valore aggiunto destinate al consumo finale (tabella 3).

	LATTE SCREMATO IN POLVERE		LATTE INTERO IN POLVERE	
	IMPORT	EXPORT	IMPORT	EXPORT
2000	78	357	8	575
2001	57	143	19	478
2002	69	161	18	495
2003	93	222	16	481
2004	26	283	3	517
2005	7	194	2	490
Var. % 2005/04	-72,9	-31,1	-33,3	-5,3

Tabella 2: scambi dei principali prodotti lattiero-caseari della UE con i paesi terzi (.000 tonnellate)

Prodotti	2005		Var. % 2005/04	
	Import	Expot	Import	Export
LATTE SCREMATO IN POLVERE	105.598	1.581	-15.12	60.46
Di cui latte scremato in polvere, confez.	2.668	433	81,01	35,83
LATTE P.S E INTERO IN POLVERE	21.179	1.144	7.18	48.39
Di cui latte p.s e intero in polvere, confez.	1.828	485	92.89	-17.02
LATTE CONDENSATO	7.712	376	-78.07	-21.74

Tabella 3: Scambi con l'estero dell'Italia di prodotti lattiero-caseari in quantità nel 2005 (tonnellate)

Prendendo in considerazione anche i nuovi paesi membri si osservano incrementi che vanno dal 17% del burro al 7% del latte in polvere

passando per il 12-13% del latte intero in polvere, mentre senza i nuovi paesi membri vi è una tendenziale stagnazione dei consumi dei derivati del latte.

2.2 – IL LATTE IN POLVERE E PRODOTTI PER L'INFANZIA

La direttiva CE 114/2001 (attuata in Italia con il D. Lgs. 49/2004) sugli alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento dà delle definizioni a tale riguardo:

- *“lattanti si intendono i bambini di meno di 12 mesi di età”,*
- *“alimenti per lattanti si intendono i prodotti alimentari destinati alla particolare alimentazione dei lattanti nei primi quattro-sei mesi di vita, in grado di soddisfare da soli al fabbisogno nutritivo di questa fascia di età”,*
- *“alimenti di proseguimento” si intendono i prodotti alimentari destinati alla particolare alimentazione della prima infanzia dopo il quarto mese di vita, costituenti il principale elemento liquido nell’ambito dell’alimentazione progressivamente diversificata per questa fascia di età”.*

Vi sono anche alimenti dietetici destinati a fini medici speciali, i quali intendono rispondere alle particolari esigenze nutrizionali di persone affette da una malattia, un disturbo o uno stato patologico specifici o malnutrite a causa di tali condizioni. Tali prodotti devono essere utilizzati sotto sorveglianza medica, con l'aiuto di altri esperti professionisti del settore sanitario.

Il latte formulato in polvere è considerato, dalla vigente legislazione, latte conservato e precisamente è: *“il prodotto solido ottenuto direttamente mediante eliminazione dell’acqua dal latte intero, parzialmente o totalmente scremato, dalla crema di latte o da una miscela di tali prodotti,*

il cui tenore in acqua è uguale o inferiore al 5% del peso del prodotto finito”.

Di esso è possibile individuarne due categorie: lattini del primo periodo e di proseguimento, i quali presentano necessariamente composizioni differenti legate alle diverse esigenze del bambino nel tempo.

Una composizione media del latte formulato in polvere, intero e scremato, è riportata nella tabella 4.

Composizione del latte in polvere		
	Intero	Scremato
ACQUA	1-5 %	1 - 5 %
GRASSI	26 - 28 %	0,5 - 2 %
LATTOSIO	40 %	51 - 55 %
SOSTANZE AZOTATE	22 - 24 %	33 - 38 %
SALI MINERALI	8 %	10 - 11 %

Tabella 4: Composizione del latte in polvere

Questi prodotti sono presentati al consumatore con diverse tipologie di confezioni come per esempio in alluminio con adeguato coperchio in plastica removibile che consente la protezione del prodotto quando non viene utilizzato, anche perché generalmente contengono 800-900 g, mentre altri possono arrivare fino a 2,5 kg (prodotti asiatici).

Un'altra tipologia di commercializzazione del latte in polvere è rappresentata dalle confezioni cartonate che contengono a seconda della marca commerciale uno, due o tre sacchetti; il contenuto effettivo della confezione di vendita è paragonabile a quello in latta.

Tale tipologie di prodotti, inoltre, contiene al suo interno uno o più misurini necessari alla preparazione del prodotto la quale è scrupolosamente descritta e raffigurata sulla confezione con relative avvertenze.

Per quanto riguarda altri prodotti per l'infanzia, in termini di commercializzazione, l'omogeneizzato è quello che presenta maggior

uniformità di vendita: infatti, sullo scaffale, pur essendoci differenti marche, si presenta sempre in vasetto da 80-100 g, a vendita singola o doppia, con apposito coperchio in metallo che garantisce il sottovuoto. I gusti sono numerosi e possono variare da frutta, mix di frutta, carne e pesce. Sul vasetto stesso o sulla confezione, generalmente cartonata, sono contenute una serie di informazioni.

Altri alimenti per l'infanzia comprendono creme ai cereali (riso, semolino, mais e tapioca, multicereali), pappe latte (mela, biscotti e frutta mista) e biscotto granulato. La confezione si presenta con un'opportuna busta, che ha un contenuto medio di 250 gr, posta all'interno di una confezione cartonata che riporta pressappoco le stesse indicazioni presenti sugli omogeneizzati in aggiunta però vi troviamo le indicazioni, talvolta illustrate, riguardo alla preparazione dell'alimento.

3 - TECNICHE DI CONSERVAZIONE DEGLI ALIMENTI

La crescita dei microrganismi negli alimenti è influenzata da una serie di fattori che possono essere intrinseci all'alimento come nel caso del pH, A_w , potenziale redox e nutrienti o inibenti ed estrinseci all'alimento come la temperatura, l'atmosfera, la luce e l'umidità dell'aria.

L'industria alimentare lavora su questi fattori con lo scopo di controllare o limitare lo sviluppo microbico tal volta ottenuto mediante *hurdly technology*.

La conservazione di un alimento può essere prolungata mediante l'utilizzo di mezzi fisici quali le radiazioni elettromagnetiche e la filtrazione; l'utilizzo delle alte temperature quali la sterilizzazione e la pastorizzazione; la disidratazione come l'essiccamento e la liofilizzazione nonché l'utilizzo dei conservanti chimici.

3.1 - L' ESSICCAMENTO

Lo scopo dell'essiccamento è quello di sottrarre dell'acqua all'alimento, essendo questa indispensabile per le attività metaboliche dei microrganismi, in modo tale da aumentare il tempo di conservazione del prodotto.

L'acqua funziona da solvente dei nutrienti e come agente chimico delle reazioni di idrolisi, dalle quali si ottengono composti (aminoacidi, carboidrati, grassi) fondamentali per la formazione di nuove molecole per la produzione di energia.

3.2 – ATTIVITA' DELL'ACQUA (A_w)

L'acqua libera di un mezzo, disponibile per reazioni chimiche, è definita A_w . Essa è espressa come il rapporto tra la tensione di vapore della soluzione (p) e la tensione di vapore dell'acqua distillata o solvente (p_0) e

varia da 0 a 1, in cui 1 è l'acqua distillata, ossia priva di sali. In una soluzione, A_w diminuisce con l'aumentare della concentrazione per la sottrazione d'acqua da parte delle molecole del soluto.

La conseguenza della diminuzione dell' A_w è la plasmolisi della cellula batterica, all'abbassarsi di tale valore il microorganismo perde dell'acqua intracellulare con conseguente alterazione delle attività metaboliche.

I microrganismi riescono a svilupparsi entro un determinato intervallo di A_w , con un *optimum* intorno a 0,990-0,950; al di sotto la crescita viene rallentata.

I microrganismi presentano una sensibilità differente verso questo parametro infatti i batteri Gram negativi sono quelli che presentano una maggior sensibilità mentre lieviti e muffe tollerano A_w più bassi.

4 - TECNOLOGIA DI PRODUZIONE DEL LATTE IN POLVERE

Il sistema più importante di essiccamento per i prodotti liquidi è l'essiccamento *spray*; esso è adottato oltre che per l'essiccamento di latte e derivati anche di estratti di caffè e di orzo, prodotti *istant* da prima colazione, succhi di frutta, lieviti, ecc.

Nell'essiccamento *spray* (Peri and Zanoni 1994) il prodotto viene nebulizzato in una camera in cui viene in contatto con aria calda e si essicca rapidamente. Molto spesso le polveri così ottenute sono sottoposte a un processo di istantaneizzazione. Nella figura 1 è riportato uno schema di essiccatore *spray* a ciclo aperto. L'operazione si può suddividere in tre fasi:

- **1° fase di atomizzazione** del prodotto da essicare in una corrente d'aria calda. L'atomizzazione viene effettuata o con ugelli ad alta pressione o con atomizzatori centrifughi. La finezza e l'omogeneità della nebulizzazione sono essenziali per un buon funzionamento dell'impianto; esse dipendono da molte variabili e, in particolare, dalla velocità di rotazione degli atomizzatori centrifughi e dalla tensione superficiale del prodotto liquido. In generale, gli atomizzatori ad ugello producono gocce con diametri di 150-250 μm mentre quelli centrifughi danno gocce di 50-125 μm .

L'aria che proviene da un riscaldatore indiretto o da un bruciatore è filtrata e, viene alimentata a temperature comprese fra 180 e 220 °C, generalmente in equicorrente, per minimizzare gli effetti di danno termico.

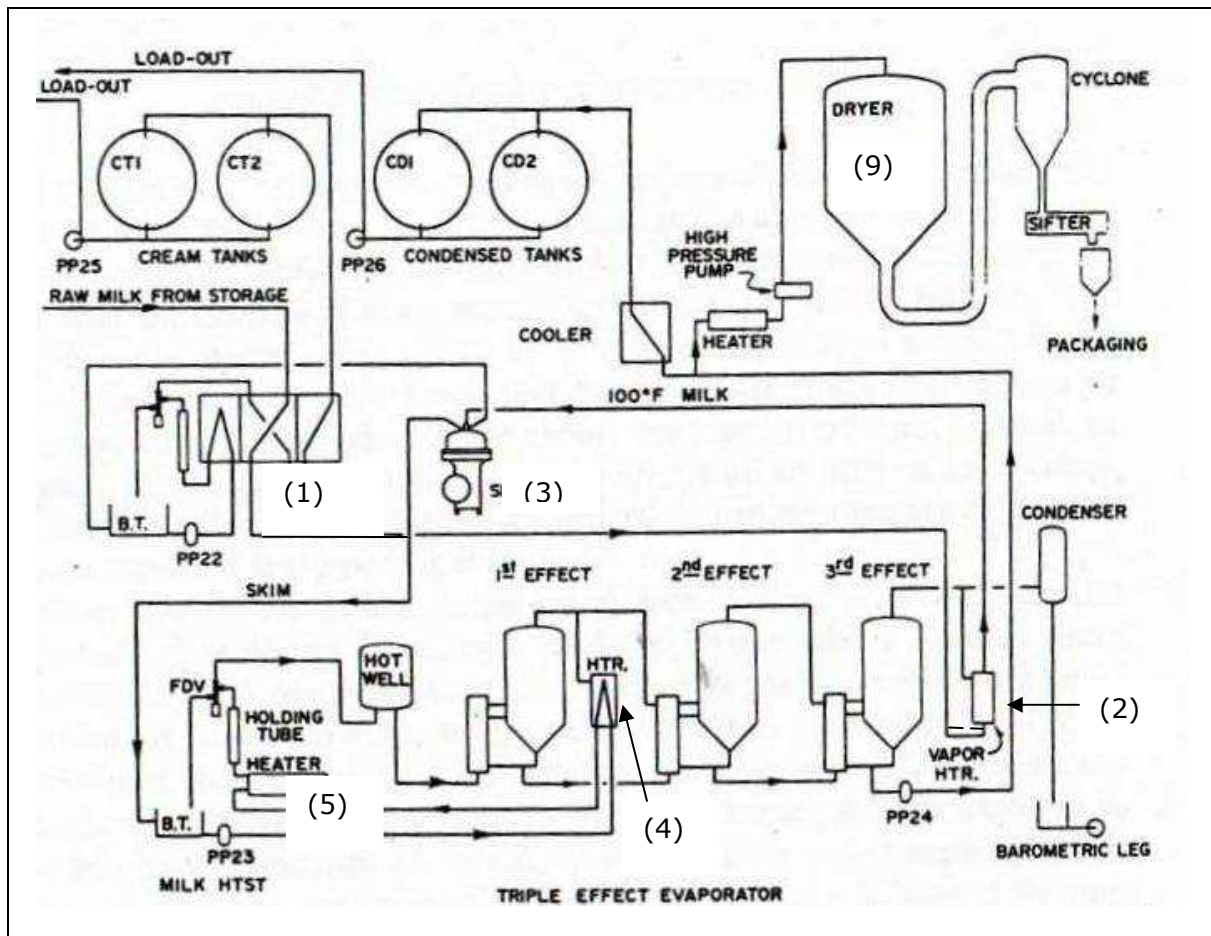
- **2° fase di essiccamento all'interno della camera di essiccamento.** Il dimensionamento della camera di essiccamento è un fattore critico di efficienza: si deve fare in modo che le gocce siano ben essiccate quando raggiungono le pareti della camera di essiccamento,

altrimenti vi si appiccicano e vi rimangono per lunghi tempi subendo una forte degradazione. In alcuni casi, le pareti della camera di essiccazione sono tenute pulite da spazzole o da sistemi vibranti che provvedono a rimuovere continuamente la polvere che vi aderisce.

- **3° fase di recupero della polvere e scarico dell'aria.**

All'interno della camera di essiccamento ci sono due punti di scarico delle polveri: uno dal basso per le particelle di maggiori dimensioni, che decantano per gravità; e uno posto a una certa altezza attraverso il quale escono l'aria esausta e le particelle più fini. Queste ultime vengono catturate da un ciclone e riunite alle più grosse in un condotto di trasferimento pneumatico che finisce a un altro ciclone. Da questo ultimo le polveri escono per essere raccolte ed eventualmente imballate.

L'aria che esce dai due cicloni, che può contenere ancora delle particelle molto fini, passa attraverso un filtro o uno *scrubber* nel quale le particelle sono abbattute da una pioggia d'acqua ottenendo una soluzione che viene riciclata. L'aria esausta e depurata viene infine scaricata nell'atmosfera.



- (1) preriscaldamento latte grezzo
- (2) ulteriore riscaldamento latte grezzo
- (3) scrematrice
- (4) preriscaldamento latte scremato
- (5) riscaldatore latte scremato
- (6) polmone caldo
- (7) concentratore a tre effetti evaporativo
- (8) riscaldatore
- (9) essicatore spray per essiccazione latte in polvere
- (10) ciclone di separazione
- (11) pastorizzatore crema

Figura 1: diagramma di un tipico impianto di essiccazione del latte in polvere

Le varianti costruttive e di funzionamento rispetto allo schema generale sono numerose; vi sono, inoltre, diversi possibili arrangiamenti dei flussi di prodotto e dell'aria all'interno della camera di essiccamento (figura 2). Quanto descritto rappresenta il corpo principale del processo che porta alla formazione dei prodotti in polvere, esso comprende però molte altre fasi.

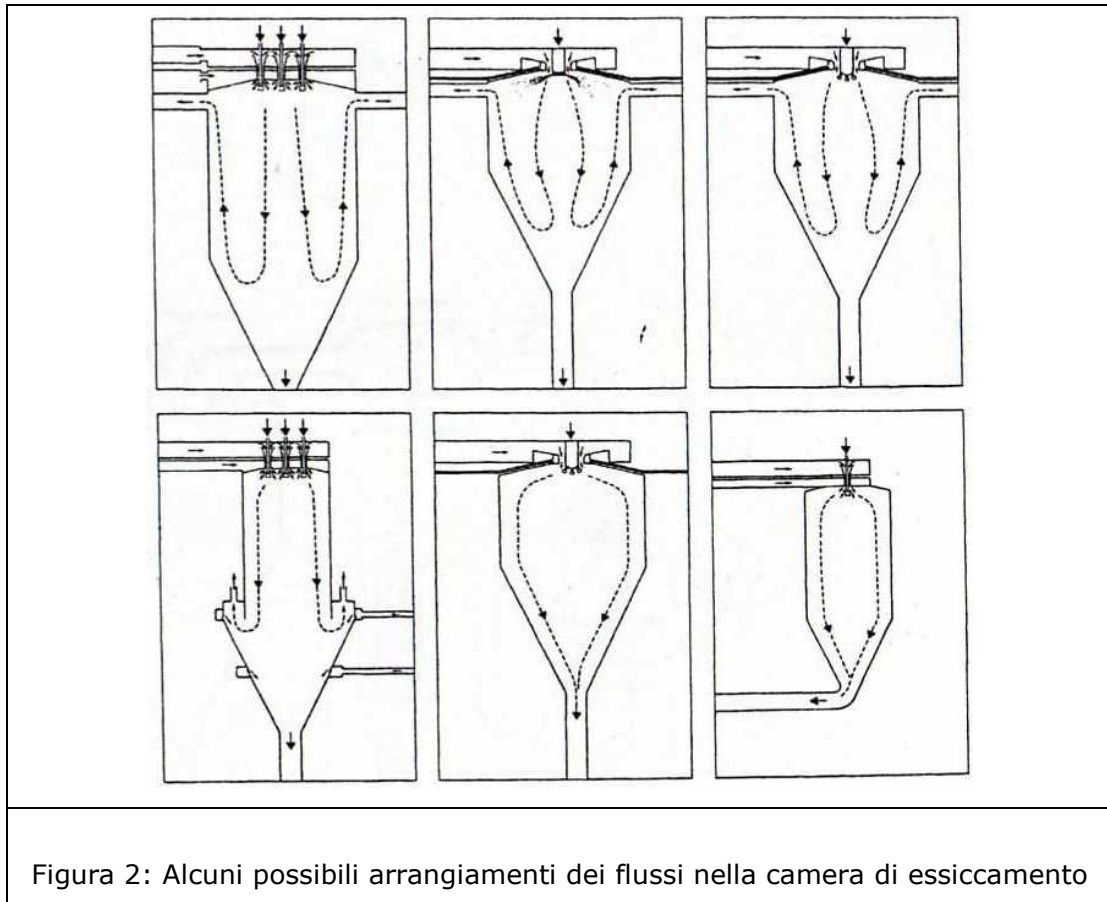


Figura 2: Alcuni possibili arrangiamenti dei flussi nella camera di essiccamento

4.1 - Istantaneizzazione

La caratteristica merceologica più importante di un prodotto in polvere è la sua reidratabilità, cioè la rapidità e completezza con cui può essere disciolto in acqua.

Si è osservato innanzitutto che le polveri più fini si reidratano con maggior fatica di quelle grosse e quelle più leggere più difficilmente di quelle a maggior densità.

Per questo motivo "i fini" che si ottengono nell'essiccamento *spray* non sono riuniti al resto delle polveri, ma vengono riciclati per favorirne l'agglomerazione con le polveri che si vanno formando nell'essiccatore. Ciò avviene generalmente a livello dell'atomizzatore. Oltre a ciò si può effettuare un'operazione di agglomerazione ed essiccamento supplementari sulle polveri, che viene detta istantaneizzazione e che ha come conseguenza di rendere "istantaneamente" reidratabili le polveri (figura 3). In pratica, le polveri uscenti dall'essiccatore *spray* vengono disperse in una camera in cui si invia dell'acqua finemente nebulizzata o del vapore saturo; questo bagna la superficie delle particelle e ne provoca l'agglomerazione in ammassi più o meno grandi in cui le singole particelle hanno uno o pochi punti di contatto generando così una struttura molto porosa. Successivamente, tali aggregati di particelle sono definitivamente disidratati in essiccatori a letto fluido.

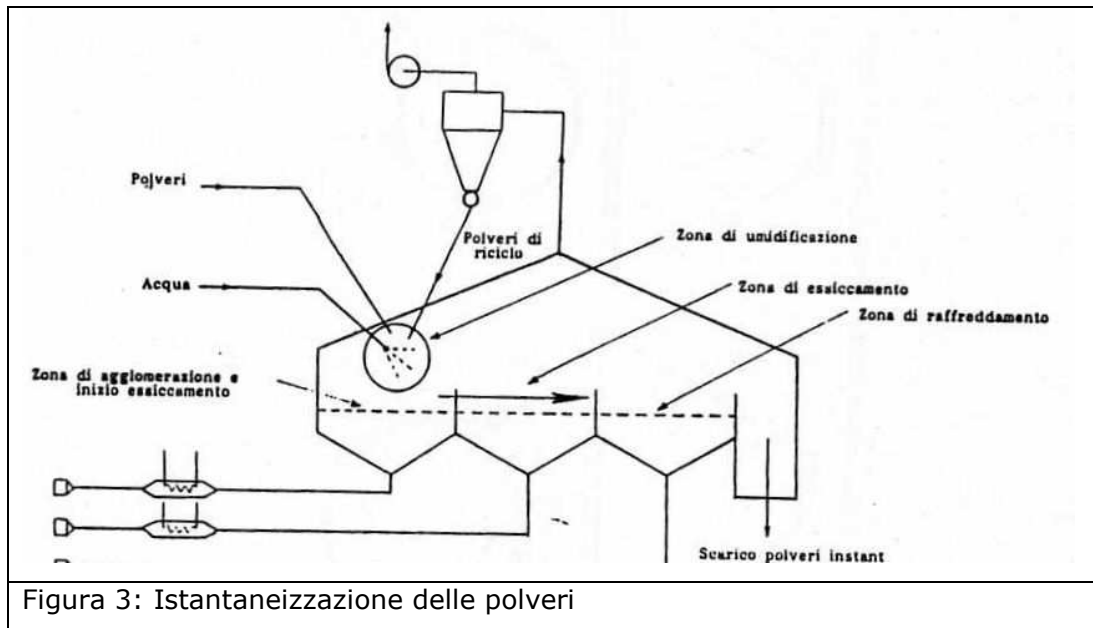


Figura 3: Istantaneizzazione delle polveri

Le polveri "istant" consistono per tanto in agglomerati che hanno qualche millimetro di diametro; queste si reidratano facilmente poiché assorbono, per capillarità, l'acqua nel loro interno e una grande superficie viene così bagnata e si scioglie rapidamente.

Si evita così il fenomeno di formazione di grumi che si verifica per aggregazione superficiale quando una polvere costituita da tante particelle singole viene messa in acqua.

Il trattamento termico che il latte in polvere subisce effettua un risanamento dello stesso da un punto di vista microbiologico; si può desumere che probabilmente la contaminazione avvenga in qualche punto tra il processo di *spray-drying* e il successivo confezionamento.

In condizioni di ambiente caldo e secco, come si ha in prossimità di essiccatori nelle industrie, il batterio si trova competitivamente avvantaggiato rispetto ad altre Enterobacteriaceae: ciò è dovuto alla buona sopravvivenza delle cellule di *E. sakazakii* sottoposte a essiccazione a elevate temperature (45 °C) e la capacità di crescere fino a 47 °C (Brewer *et al.*, 2003; Edelson *et al.*, 2004).

5 - NORME E REGOLAMENTI

Uno degli obiettivi fondamentali della legislazione alimentare è quello di garantire un elevato livello di protezione della salute pubblica. A tale proposito negli ultimi anni la Comunità Europea ha emanato una serie di regolamenti che mirano alla sicurezza alimentare.

La sicurezza dei prodotti alimentari è garantita principalmente da misure di prevenzione, quali la messa in atto di pratiche corrette in materia di igiene e di procedure basate sui principi dell'analisi dei rischi e dei punti critici di controllo (procedure HACCP). Dei criteri microbiologici possono essere applicati per la validazione e la verifica di procedure HACCP e di altre misure di controllo dell'igiene.

Il Regolamento (CE) n. 2073 del 2005, che tratta dei criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, ha preso in considerazione anche gli alimenti destinati all'infanzia, specificando che, a seguito di un'opinione dell'EFSA sui rischi microbiologici degli alimenti per lattanti e degli alimenti di proseguimento, *"Salmonella e Enterobacter sakazakii sono i microrganismi che costituiscono motivo di maggiore preoccupazione per quanto riguarda gli alimenti per lattanti, gli alimenti di proseguimento e gli alimenti a fini medici speciali."*

La presenza di questi agenti patogeni rappresenta un rischio considerevole se le condizioni dopo la ricostituzione dell'alimento ne permettono la moltiplicazione."

Lo stesso regolamento riteneva che le Enterobacteriaceae potessero essere utilizzate come indicatore di rischio sia nel processo di produzione che nel prodotto finito; questo perché, oltre alle specie patogene, la famiglia Enterobacteriaceae comprende anche specie ambientali spesso presenti nel ciclo di produzione degli alimenti, ma innocue dal punto di vista sanitario.

I regolamento (CE) 1441 del 2007, che va a modificare il 2073 del 2005, definisce che: " *qualora siano sottoposti a test alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere e vengano riscontrate enterobatteriaceae in qualunque unità del campione, l'intero lotto deve essere testato per Enterobacter sakazakii e Salmonella*".

La stessa EFSA sostiene che " *non è possibile stabilire una correlazione tra le Enterobacteriaceae e la Salmonella e che non esiste una correlazione universale tra Enterobacteriaceae e l'Enterobacter sakazakii*".

Per tanto si evidenzia un diverso punto di vista infatti in precedenza si sosteneva che vi fosse una diretta relazione tra la presenza di Enterobacteriaceae, *Salmonella* spp e *E. sakazakii*.

I criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari (tabella 5) definiti dai regolamenti sono distinguibili in:

- criteri d'igiene di processo che prevede la ricerca di: Enterobacteriaceae, stafilococchi coagulasi positivi e presunto *Bacillus cereus* per i quali se si dovessero ottenere risultati insoddisfacenti è necessario procedere con il miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione per minimizzare la contaminazione;
- criteri di sicurezza alimentare per i quali viene indicata, a seconda del prodotto, la ricerca di *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *E. sakazakii* da applicare a prodotti immessi sul mercato durante il periodo di conservabilità.

CRITERI DI SICUREZZA ALIMENTARE				
Categoria alimentare	Microrganismo	campionamento		Limiti
		n	c	
Alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Assente in 25 g
Latte in polvere e siero di latte in polvere	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g
Alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai sei mesi	<i>Salmonella</i>	30	0	Assente in 25 g
	<i>Enterobacter sakazakii</i> ⁽¹⁾	30	0	Assente in 10 g
Alimenti di proseguimento in polvere	<i>Salmonella</i>	30	0	Assente in 10 g
CRITERI D'IGIENE E DI PROCESSO				
Latte in polvere e siero di latte in polvere	Enterobacteriaceae	5	0	10 ufc/g
	Stafilococchi coagulasi positivi	5	2	m= 10 ufc/g M 100 ufc/g
Alimenti di proseguimento in polvere	Enterobacteriaceae	5	0	Assente in 10 g
Alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai sei mesi	Enterobacteriaceae	10	0	Assente in 10 g
	<i>Bacillus cereus</i>	5	1	m= 50 ufc/g
	Presunto			M=500 ufc/g

⁽¹⁾ Vanno effettuati esami in parallelo per Enterobacteriaceae e *E. sakazakii*, a meno che non sia stata stabilita a livello del singolo impianto una correlazione tra questi microrganismi. Se in una delle unità campionarie sono rilevate Enterobacteriaceae, la partita deve essere sottoposta a test per ricercare l'*E. sakazakii*. Spetta al fabbricante dimostrare, con soddisfazione dell' autorità competente, se esiste una correlazione tra Enterobacteriaceae e *E. sakazakii*.

Tabella 5: Parametri microbiologici definiti dal 2073/2005

6 – FAMIGLIA ENTEROBACTERIACEAE

Le Enterobacteriaceae sono ubiquitarie. Esse si trovano nel suolo, nell'acqua, nella frutta, nelle uova, nella carne, nei vegetali, nei cereali, nei fiori e nelle piante; la loro patogenicità per l'uomo e gli animali e la loro importanza economica è dovuta al ridotto tempo di generazione.

Le Enterobacteriaceae, in particolare i generi *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, sono membri della flora microbica intestinale umana; sono la più importante famiglia di batteri Gram-negativi responsabili di infezioni delle vie biliari, della prostata, del tratto urinario, in genere conseguenti all'uso di cateteri non igienicamente sanitizzati e delle più comuni infezioni nosocomiali. L'intestino è la principale sorgente di disseminazione e trasmissione di questi potenziali patogeni ai siti sensibili (Zogaj *et al.*, 2003).

Le Enterobacteriaceae però non sono solo responsabili di infezioni e malattie a carico dell'uomo ma possono riguardare anche gli animali.

Ad esempio, la salmonellosi nel pollo e nelle uova è un problema mondiale sia per gli allevatori di polli che per il consumatore; essa colpisce anche maiali, cavalli, mucche, cani e gatti.

Klebsiella spp. e *Citrobacter freundii* sono responsabili di mastiti nei bovini.

Altre specie appartenenti alle Enterobacteriaceae sono responsabili di numerose altre infezioni animali, inoltre, all'interno di questa famiglia troviamo anche *Salmonella typhi* che è la causa della febbre tifoide e *Yersinia pestis* la quale causa la peste bubbonica.

Gli agenti responsabili di queste malattie possono essere divisi in due gruppi: specie che possono essere normalmente patogene tra le quali troviamo *Salmonella*, *Shigella*, *K. pneumoniae*, *Y. pestis*, diversi sierotipi di *E. coli* e *Y. enterocolitica* e specie che causano malattie in certe circostanze. I membri di questo secondo gruppo sono definiti patogeni

opportunisti; l'ospite compromesso (ad esempio diabete, immunodepressione, infezioni, AIDS) è vulnerabile alle infezioni nosocomiali causate da questi patogeni opportunisti.

Le Enterobacteriaceae sono largamente responsabili di una sostanziale percentuale di infezioni nosocomiali negli Stati Uniti, includendo anche infezioni all'apparato urinario, infezioni chirurgiche, infezione alle basse vie respiratorie e batterimie. (Bergey 2005)

Salmonella spp., *E. coli*, *Yersinia enterocolitica* e *Shigella* spp. sono la causa più frequente di epidemie di origine alimentare. *E. coli* O157:H7 ha causato delle epidemie negli Stati Uniti, Europa, Asia e Africa; in particolare, negli Stati Uniti questo microrganismo è la principale causa della sindrome uremica emolitica, la maggior causa insufficienza renale acuta nei bambini.

Un'importante veicolo di questa famiglia è rappresentato dall'acqua ed è per questa ragione che possono causare numerosi problemi negli alimenti (Bergey 2005).

Un quadro più completo dei principali generi appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae e la loro importanza è riassunto nella tabella 6.

Da quanto detto, si può capire facilmente l'importanza che rivestono i microrganismi appartenenti a questa famiglia non solo per la loro ubiquità ma anche per la loro importanza a livello di malattie alimentari.

Il lavoro svolto si è concentrato sulla ricerca delle specie appartenenti a questa famiglia nel latte in polvere e nei prodotti per l'infanzia mostrando particolare interesse soprattutto nei confronti di *E. sakazakii*.

E. sakazakii appartiene al genere *Enterobacter*; le specie che vi appartengono si caratterizzano per la grande resistenza agli agenti disinfettanti e antimicrobici a differenza di altri generi appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae; inoltre un punto di forza di molte delle specie appartenenti al genere in questione è rappresentato dalle proprietà adesive.

GENERE	HABITAT	IMPORTANZA IN PATOLOGIA
<i>Escherichia</i>	Intestino dell'uomo e degli animali	Opportunisti; alcuni ceppi sono enteropatogeni ed enterotossici.
<i>Shigella</i>	Intestino dell'uomo e degli animali	Dissenteria bacillare
<i>Salmonella</i>	Intestino dell'uomo e degli animali	A seconda della specie: tifo addominale e tossinfezioni alimentari
<i>Citrobacter</i>	Acqua, suolo, alimenti, intestino dell'uomo e degli animali	Patogeno opportunisto può causare infezioni urinarie e otiti
<i>Klebsiella</i>	Acqua, suolo, alimenti, intestino dell'uomo e degli animali	Patogeni occasionali dell'apparato respiratorio e urinario
<i>Enterobacter</i>	Suolo e vegetazione, intestino dell'uomo e degli animali, acque reflue	Si riscontra raramente nelle urine e nel pus come patogeno opportunisto
<i>Serratia</i>	Acqua, suolo, prodotti alimentari	Patogeno opportunisto
<i>Hafnia</i>	Suolo acque, alimenti, tratto intestinale	Privi di potere patogeno, opportunisti eccezionali
<i>Proteus</i>	Acqua, suolo, tratto intestinale dell'uomo e degli animali	Patogeni occasionali: infezioni urinarie, gastroenteriti, otiti, pleuriti
<i>Providencia</i>	Tratto intestinale e urinario dell'uomo	Infezioni urinarie e di ferite
<i>Morganella</i>	Intestino dell'uomo e degli altri mammiferi	Patogeno opportunisto provoca infezioni urinarie
<i>Yersinia</i>	Animali, uomo	A seconda della specie: peste, gastroenteriti acute

Tabella 6: Importanza Enterobacteriaceae

Enterobacter spp. è responsabile di molte delle batterimie acquisite in ospedale prima fra tutte si trovano *E. cloacae*, *E. agglomerans*, *E. sakazakii* ma non sono i soli. Il 14-53% delle batterimie non sono a carico di una sola specie e generalmente colpiscono pazienti che presentano severe malattie e anziani che non godono di ottime condizioni di salute.

Enterobacter spp. sono responsabili anche di infezioni a carico del tratto urinario le quali possono causare batterimie asintomatiche; possono, inoltre, causare meningiti, ascessi al cervello.

A livello del tratto respiratorio *Enterobacter* spp. può evolvere in colonizzazioni asintomatiche di secrezioni respiratorie, ascessi polmonari e polmoniti (Brenner *et al.*, 2005).

7 - ENTEROBACTER SAKAZAKII

E. sakazakii, microrganismo il cui nome è riferito al ricercatore giapponese Ricki Sakazakii, è considerato un patogeno emergente in quanto solo recentemente ha attirato l'attenzione della comunità scientifica e delle agenzie governative preposte alla sicurezza degli alimenti in seguito alla osservazione di alcuni casi di infezione a veicolo alimentare in un particolare gruppo sensibile: i soggetti in età perinatale. Il primo caso di meningite neonatale attribuito a questo germe risale al 1961. Da allora il microrganismo è risultato responsabile di un numero crescente sia di casi sporadici che di piccoli focolai di infezione in neonati e bambini nati prematuri.

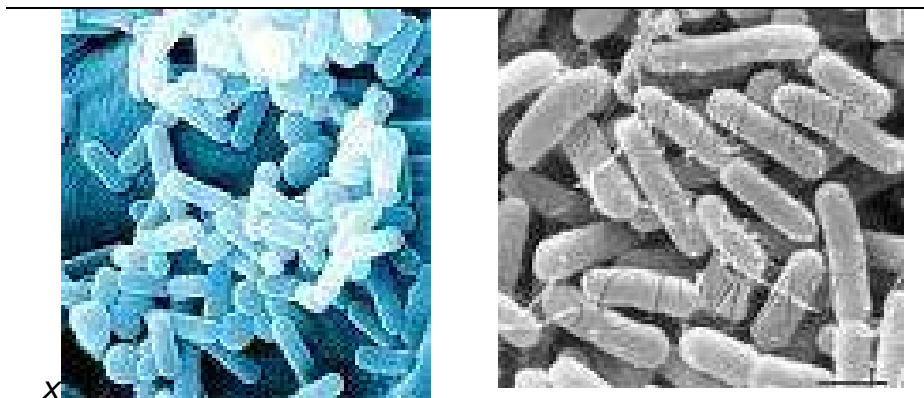


Figura 1: *E. sakazakii* al microscopio

E. sakazakii è stato isolato da una vasta gamma di alimenti; tuttavia la maggior parte dei ricercatori ha concentrato la propria attenzione sulla presenza del microrganismo nel latte formulato in polvere per neonati poiché esistono significative correlazioni epidemiologiche tra il consumo di latte e l'infezione da *E. sakazakii*.

Nel 2002 l'*International Commission on Microbiological Specifications for Food* (ICMSF) ha descritto *E. sakazakii* come "una grave minaccia per particolari categorie di persone, delle quali il batterio mette a rischio la

stessa vita o comunque ne può alterare significativamente la qualità a causa dei postumi, anche a lungo termine, dovuti all'infezione".

Le infezioni da *E. sakazakii* continuano a rimanere rare, ma sono riscontrabili molto più frequentemente a carico di neonati e bambini piuttosto che negli adulti.

7.1 - CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE

E. sakazakii è un bacillo con dimensioni pari a 0,6-1,0 x 1,2-3,0 µm, paragonabile agli altri generi appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae. Mobile grazie a flagelli peritrichi, anaerobi facoltativi e generalmente ossidasi negativi; fermentano il glucosio con produzione di acido e gas, sono positivi alla reazione Voges-Proskauer, alle reazioni della β-glucosidasi e di assimilazione del citrato, negativi al test del rosso metile. Fino al 1980 si pensava fosse una variante giallo pigmentata di *E. cloacae* in quanto molto simili sia fenotipicamente. Come profilo biochimico (tabella 7), una delle principali differenze è la produzione di una pigmentazione gialla visibile in coltura. Solo in seguito a studi tassonomici effettuati sul DNA del nuovo isolato si è arrivati alla conclusione che si trattava di una specie distinta e fu battezzata con il nome di *E. sakazakii*.

Per quanto riguarda la sua coltivazione in laboratorio, *E. sakazakii* cresce facilmente sui comuni terreni di coltura, producendo pigmento giallo in particolare su *Trypicase Soy Agar* (TSA) il quale è più evidente dopo incubazione a 25° C piuttosto che a 37° C per 24-48 ore; a 44° C la crescita risulta essere ottima anche se la produzione di pigmento è debole. Si possono osservare due tipi di colonie morfologicamente diverse: colonie dentellate, rugose e asciutte e colonie lisce. Non è noto se questo diverso aspetto sia correlato a variazioni di virulenza o a differenze fenotipiche o genotipiche (Lehner *et al.*, 2004).

Test	Reazioni di <i>Enterobacter</i> ^a				
	sakazakii	cloacae	aerogenes	agglomerans	gergoviae
Lisina decarbossilasi	-	-	+	-	+
Arginino diidrolasi	+	+	-	-	-
Ornitina decarbossilasi	+	+	+	-	+
Crescita in KCN	+	+	+	V	-
Fermentazione di :					
Saccarosio	+	+	+	(+)	+
Dulcitolio	-	(-)	-	(-)	-
Adonitolio	-	(-)	+	-	-
Rafnosio	+	+	+	V	+
D-sorbitolo	-	+	+	V	-
X-metil-D-glucoside	+	(+)	-	-	-
D-arabitolio	-	(-)	+	-	+
Pigmento giallo	+	-	-	(+)	-

^a + indica il 90-100% di positività; (+): 75-89% di positività; V: 25-74% di positività; (-): il 10-24% di positività; -: 0-9% di positività

Tabella 7: Differenze biochimiche tra le varie specie di *Enterobacter*

7.1.1 - CAPSULA

E. sakazakii può presentare anche una capsula composta da eteropolisaccaridi (29-30% acido galatturonico, 23-30% glucosio, 19-24% galattosio, 13-22% fucosio) cui probabilmente si deve la lunga sopravvivenza, fino a 24 mesi, del microrganismo nel latte in polvere. La capsula, inoltre, è responsabile della formazione di una pellicola sulle superfici di attrezzature e recipienti con cui il microrganismo viene a contatto e dove può quindi permanere. A questo riguardo degli studi hanno verificato la capacità di alcuni ceppi di *E. sakazakii* di aderire a superfici di silicone, lattice, policarbonati, acciaio, evidenziando la minore produzione di biofilm su quest'ultimo. I ceppi capsulati, si sono rivelati capaci di formare pellicole più dense, con una maggiore concentrazione di cellule batteriche, su silicone, lattice e policarbonati. Si tratta di materiali abitualmente usati nella fabbricazione di contenitori e utensili per il latte in

polvere e per il prodotto ricostituito, sui quali *E. sakazakii*, già presente nel latte in polvere, può annidarsi (Iversen *et al.*, 2004b).

7.1.2 - TEMPI DI DUPLICAZIONE E TERMOTOLLERANZA

Diversi autori riportano che il tempo di duplicazione di *E. sakazakii* a 23 °C è di 40 minuti e a 10 °C è compreso tra 4,18 ore e 5,52 ore; invece, a 4 °C non si ha crescita (Nazarowec *et al.*, 2003). È stato ripetutamente dimostrato che la temperatura interna dei frigoriferi domestici spesso è più elevata di quella indicata dal display o prevista nel libretto di istruzione (in genere varia tra 7 e 10° C): questi valori consentono, invece, la moltiplicazione dell'*E. sakazakii* (Nazarowec , 1997c).

Nel latte formulato ricostituito e mantenuto a temperatura ambiente (25 °C), il microrganismo ha un tempo di duplicazione di circa 75 minuti; mentre i tempi di duplicazione dei ceppi clinici e alimentari sono 13,7 h a 6 °C, 1,7 h a 21 °C e 19-21 min a 37 °C (Iversen *et al.*, 2004).

Al confronto, i tempi di duplicazione degli altri microrganismi che più frequentemente si possono riscontrare in latte e derivati risultano più lunghi.

È stato dimostrato che partendo da latte in polvere ricostituito e lasciato a temperatura ambiente con una concentrazione iniziale di 1 UFC/ml *E. sakazakii* si raggiungono in 10 ore 10^7 UFC/ml. Il valore ottenuto è prossimo a quello della dose minima letale (DL nel topo = 10^8 UFC).

Non si conosce attualmente come la variazione del pH e dell'attività dell'acqua influenzino la moltiplicazione del microrganismo (Iversen e Forsythe, 2003).

7.1.3 - OSMOTOLLERANZA

E. sakazakii mostra una certa attitudine all'osmotolleranza: questa sua proprietà favorirebbe la sopravvivenza del microrganismo nel latte in polvere che ha un'attività dell'acqua (A_w) pari a circa 0,2.

Tale microrganismo è in grado di proteggersi dallo stress osmotico accumulando rapidamente al proprio interno ioni; in particolare K^+ e in seguito soluti compatibili, come prolina, glicina e in particolare trealosio, un disaccaride del glucosio, che sembra stabilizzare le proteine e i fosfolipidi della membrana batterica (Kempf *et al*, 1998).

Breeuwer e coll. (2003) hanno messo in relazione l'aumento intracellulare della concentrazione di trealosio con la resistenza all'essiccamento. È stato, infatti, osservato che la concentrazione di trealosio passa da 0,040 mol/mg di proteina nella fase stazionaria di crescita e in ambiente umido (condizioni fisiologiche), a 0,23 mol/mg di proteina nella fase stazionaria e in ambiente secco (condizioni di stress).

A tale proposito è stato condotto anche un'altro studio testando la capacità di alcuni ceppi di *E. sakazakii* di sopravvivere in presenza di elevate concentrazioni di sorbitolo; in particolare la resistenza risulta massima quando il microrganismo è in fase stazionaria, mentre si riduce quando è in fase di moltiplicazione.

Nel latte formulato in polvere mantenuto a temperatura ambiente in contenitore ben chiuso, il microrganismo può sopravvivere per circa un anno e mezzo (Edelson *et al.*, 2004).

7.1.4 - ANTIBIOTICO RESISTENZA

Nonostante *E. sakazakii* sia sensibile alla terapia antibiotica comunemente impiegata per il trattamento dell'infezione, Burgos and Varala (2002) hanno segnalato un aumento dell'antibiotico-resistenza.

L'antibiotico resistenza di *E. sakazakii* sembra essere sotto il controllo di un plasmide e di un integrone (Girlich *et al.*, 2001).

7.1.5 - EFFICACIA DEL TRATTAMENTO TERMICO SUI MICRORGANISMI

7.1.5.1 - TEMPO DI RIDUZIONE DECIMALE

Convenzionalmente si indica con D (tempo di riduzione decimale) la resistenza termica dei microrganismi; tale valore indica il numero di minuti, che a un determinato valore di temperatura, sono necessari per ridurre del 90% il numero dei microrganismi.

Il valore di D per *E. sakazakii* calcolato da vari Autori (Nazarowec *et al* 1997b; Breeuwer *et al*, 2003; Edelson *et al*, 2004; Iversen *et al* 2004) varia da 0,3 a 9,9 minuti a 58° C (tabella 8).

7.1.5.2 - VALORE Z

L'aumento della temperatura necessario per ridurre a 1/10 il valore D viene chiamato valore z (espresso in °C). I valori sperimentali calcolati da diversi autori (Nazarowec *et al* 1997b; Breeuwer *et al*, 2003; Edelson *et al*, 2004; Iversen *et al* 2004) indicano un valore z compreso tra 3,1 e 5,8 °C. La variabilità dei risultati è in parte legata al diverso metodo sperimentale utilizzato e alla diversa termosensibilità dei ceppi impiegati.

Per quanto riguarda gli interventi di risanamento del latte possiamo dire che *E. sakazakii*, non sopravvive al processo di pastorizzazione (71,6 °C per 15"); infatti, alla temperatura di 72 °C resiste soltanto per 1,3 secondi circa (Nazarowec *et al.*, 1997b).

Valore D (min.)									Valore Z (C°)
52°C	53°C	54°C	56°C	58°C	60°C	62°C	65°C	70°C	
54.8		23.7	10.3	4.2	2.5				5.82 ^{*1}
			21.1	9.9	4.4		0.6	0.07	5.6 ^{*2}
		16.4	5.1	2.6	1.1	0.3			5.8 ^{*3}
		11.7	3.9	3.8	1.8	0.2			5.7 ^{*3}

^{1*} Nazarowec-White and Farber, 1997a ^{2*} Edelson-Mammel and Buchanan, 2004 ^{3*} Iversen, Druggan, and Forsythe, 2004

Tabella 8: Valore D e valore z per *E. sakazakii* nel latte formulato in polvere calcolato da parte di alcuni Autori

8 - PATOGENESI

Le fonti e le modalità di trasmissione di questo microrganismo non sono a oggi completamente chiarite. Dal momento che *E. sakazakii* non è un normale abitante della flora intestinale degli animali e dell'uomo, si suppone una diffusione soprattutto a livello ambientale, nelle acque, nei vegetali, nel suolo, trasportato da insetti e roditori; da queste fonti potrebbe giungere a contaminare gli alimenti (Iversen *et al.*, 2003). Come riportato da Kandhai e coll. (2004), tuttavia, *E. sakazakii* non è stato isolato da acque di superficie, suolo, fango, legno in decomposizione, granaglie, letame di avicoli, roditori, bovini, latte bovino non trattato, ma da miscelatori e spazzole per la pulizia dei contenitori per il latte, oltre che da vari alimenti, come formaggi, carne macinata, salsicce, verdura. Inoltre, gli stessi Autori hanno isolato il germe da campioni ambientali provenienti da diverse industrie alimentari (produttrici di latte in polvere, cioccolato, cereali, farina di patate, pasta, spezie) e da ambiente domestico. Esso è stato infine reperito anche a livello di apparato digerente di insetti (Hamilton *et al.*, 2003).

Il batterio è stato isolato da feci e urine di neonati asintomatici (WHO, 2004), mentre i soggetti ammalati rimangono eliminatori dello stesso attraverso le feci fino a 18 settimane (Block *et al.*, 2002). In essi il microrganismo è risultato isolabile da diversi distretti organici, ad esempio gola, tratto rettale, aspirati tracheali, ma non dal sangue nel caso riportato da Arseni e coll. (1987).

Al pari degli altri patogeni che causano meningiti in bambini al di sotto dei 5 anni (pneumococco, *Haemophilus* e meningococco), anche *E. sakazakii* ha un particolare tropismo per il sistema nervoso centrale.

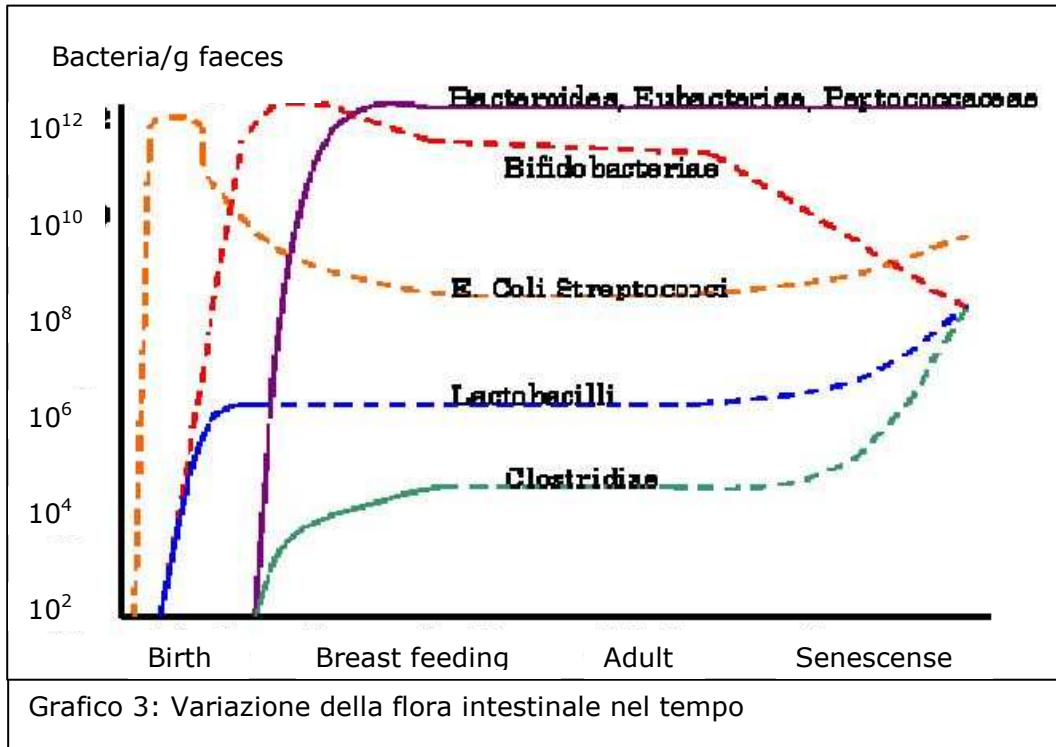
La via seguita dal patogeno, per arrivare al liquido cerebro-spinale e causare la meningite, non è stata ancora stabilita. Si ipotizza che il plesso carotideo sia il più probabile sito di ingresso e che le modalità di invasione coinvolgano meccanismi para- e trans-cellulari. I metaboliti batterici come i glicopeptidi, le endotossine, le proteasi, le collagenasi e l'elastasi, sembrano indurre la permeabilità delle barriere ematica e cerebrale facilitando, di conseguenza, l'ingresso del patogeno.

Il latte in polvere rappresenta il più importante veicolo di trasmissione del microrganismo che riesce facilmente a superare la barriera gastrica e causare l'infezione, in quanto il pH dello stomaco dei neonati risulta meno acido di quello degli adulti.

9 - SINTOMATOLOGIA E LESIONI

Tra i membri della stessa famiglia, *E. sakazakii* è considerato un patogeno opportunisto a carattere invasivo responsabile di importanti malattie quali la sepsi, le meningiti e, più raramente, l'enterocolite necrotizzante (NEC), soprattutto nei neonati prematuri, nati con basso peso, (< 2,5 kg), che rimangono ad altissimo rischio fino a un'età di 4-6 settimane dopo il termine di gravidanza (grafico 2), bambini affetti da deficit del sistema immunitario di qualsiasi età (in particolare sieropositivi per il virus HIV), bambini nati a termine di gravidanza ospedalizzati in unità neonatali

intensive, infezioni nosocomiali, specialmente nei reparti di terapia intensiva pediatrica dove causa il 50% delle infezioni; tra queste, la meningite è la forma di infezione più grave.



I segni e i sintomi della fase iniziale delle infezioni da *E. sakazakii* sono: inappetenza, irritabilità, ittero, respiro affannoso, pallore, cianosi, collasso, spasmi e instabilità della temperatura corporea (Bar-Oz *et al.*, 2001).

Negli stadi avanzati della malattia le manifestazioni patologiche più frequentemente riscontrate sono: ventricoliti, ascessi cerebrali, formazione di cisti, idrocefalo, ritardato sviluppo mentale e infarto cerebrale (Bar-Oz *et al.*, 2001; Lai, 2001; Block *et al.*, 2002).

L'enterocolite necrotizzante neonatale rappresenta l'altra importante manifestazione patologica nei neonati ed è caratterizzata da necrosi e pneumatosi intestinale. L'incidenza della malattia è del 13% nei neonati con basso peso alla nascita.

La frequenza di enterocoliti necrotizzanti in neonati alimentati con latti artificiali è dieci volte superiore rispetto a quella in neonati alimentati con

latte materno, ciò può essere spiegato dalla presenza delle immunoglobuline protettive di classe A in quest'ultimo.

Sia la meningite che l'enterocolite necrotizzante presentano un'elevata percentuale di mortalità; in particolare, l'ultima varia dal 10 al 55% (Peter *et al.*, 1999), mentre quella relativa alla meningite varia dal 40 all'80%.



Foto 1: Bambino colpito da *E. sakazakii*

Non mancano, comunque, casi di malattia tra i nati a termine sani o affetti da anomalie congenite e, quindi, più suscettibili all'infezione. Tra gli adulti infettati, la malattia a decorso generalmente grave (fino ad oggi, però, non sono stati segnalati casi di meningite) si sviluppa solo nel 50% dei casi; non sono però noti il veicolo e la dose infettante (tabella 9).

Si stima che l'incidenza dell'infezione da *E. sakazakii* tra i neonati possa essere 1 su 100.000 nati mentre, in quelli con basso peso alla nascita l'incidenza passa a 8,7 su 100.000. In effetti, sono proprio questi ultimi i soggetti più a rischio: uno studio condotto nel Regno Unito dimostra che il 52% dei casi verificatisi tra il 1961 e il 2003 era rappresentato proprio da questi ultimi, peraltro tutti direttamente collegati all'uso di latte formulato in polvere.

Nei soggetti sopravvissuti determina gravi conseguenze neurologiche, quali idrocefalo, tetraplegia e ritardo nello sviluppo neurologico (Farber, 2004); inoltre sostiene rare forme di batterimia e osteomielite negli adulti (CFSAN, 2002).

Sintomi	Riferimento
La più importante infezione in lattanti è la meningite ma si verificano anche, ascessi al cervello infarto e formazione di cisti.	Gallagher et coll, 1991.; Kleiman et coll., 1981; Kline, 1988a;Nazarowec-White and Farber, 1997b; Ries et al., 1994; Willis et coll, 1988
Congiuntiviti Distruzione del lobo frontale del cervello quadriplegia spastica, ipotermia, febbre, irritabilità ittero, rontolio respiratorio, inabilità della temperatura corporea, inappetenza, necrosi celebrale emorragica, meningo encefalite, formazione di cisti, liquefazione della materia bianca del cervello e complicazioni neurologiche severe.	Bar-Oz et coll., 2001; Block <i>et coll.</i> , 2002; Reina <i>et coll.</i> , 1989; Willis <i>et coll.</i> , 1988
Infezioni associate a cateteri Si visualizzano i segni precoci della meningite come pallore, cianosi, collasso, convulsioni e spasmi. Enterocolite necrotizzante in neonati	Arseni <i>et coll.</i> , 1985; Block <i>et coll.</i> , 2002 Muytjens <i>et coll.</i> , 1983
Ascessi cerebrali e meningiti in neonati	Muytjens <i>et coll.</i> , 1983; Van Acker <i>et coll.</i> , 2001 Burdette <i>et coll.</i> , 2000; Kleiman <i>et coll.</i> , 1981; Muytjens <i>et coll.</i> , 1983; Ries <i>et coll.</i> , 1994
Ventricoliti, infarto celebrale, cisti cerebrali, idrocefalo e ascessi cerebrali.	Bar-Oz <i>et coll.</i> , 2001; Burdette <i>et coll.</i> , 2000; Gallagher <i>et coll.</i> , 1991
Batterimia	Block <i>et coll.</i> , 2002; Burdette <i>et coll.</i> , 2000; Monroe <i>et coll.</i> , 1979; Nazarowec- <i>et coll.</i> , 1997b; Noriega <i>et coll.</i> , 1990
Includono batterimie riscontrate negli adulti Esso rappresenta un agente coinfezioso (tra tre batteri) ed è stato isolato da un'ulcerazione in piedi di un diabetico. Appendiciti e sepsi biliari	Pribyl <i>et coll.</i> , 1985 Pribyl <i>et coll.</i> , 1985; Reina <i>et coll.</i> , 1989 ; Lai, 2001
Infezioni nei pazienti anziani comprendono: urosepsi, batterimie, infezioni in un trapianto vascolare e in una ferita, polmoniti	Hawkins <i>et coll.</i> , 1991; Nazarowec <i>et coll.</i> , 1997b ; Jimenez <i>et coll.</i> , 1982 ; Hawkins <i>et coll.</i> , 1991 ; Dennison <i>et coll.</i> , 2002 ; Lai, 2001

Tabella 9 : sintomi legati all' infezione da E.sakazakii

10 - EPIDEMIOLOGIA

E. sakazakii si è reso responsabile di focolai con alto tasso di mortalità in neonati e bambini nati prematuri.

Fino ad oggi, sono un po' meno di 60 i casi di infezione segnalati nel mondo (Farber, 2004); tuttavia, si deve tener presente il fatto che il numero dei casi di infezione da *E. sakazakii* possa essere sottostimato in quanto la ricerca di questo patogeno non viene effettuata da tutti i laboratori di analisi cliniche e non tutti i Paesi hanno un sistema di notifica dei casi di malattia. In passato, la percentuale di mortalità conseguente alle infezioni da *E. sakazakii* era superiore al 50%; negli ultimi anni essa è diminuita, anche se rimane comunque relativamente alta (20%) (CAC, 2003).

I primi due casi di meningite dovuti a *E. sakazakii*, risalgono al 1961, quando il microrganismo era denominato *E. cloacae* (Biering *et al.*, 1989). Da allora, casi di malattia dovuti all'*E. sakazakii* sono stati segnalati un po' in tutto il mondo con un incremento delle segnalazioni negli ultimi anni, probabilmente per l'aumento dei soggetti a rischio e delle migliorate capacità diagnostiche (Tabella 3) (Nazarowec-Withe *et al.*, 2003).

Nel complesso, i casi fino a oggi segnalati possono essere divisi in due gruppi: sporadici e epidemici (tabella 10).

Nel 1981, un caso di meningoencefalite necrotizzante aggravata da compartimentalizzazione ventricolare e formazione di ascessi causata da *E. sakazakii*, in una neonata di 5 settimane, ricoverata presso il Dipartimento di Pediatria della Facoltà di Medicina di Indianapolis (USA), ha contribuito a confermare la patogenicità del microrganismo (Kleiman *et al.*, 1981).

Nel 1982 *E. sakazakii* fu isolato per la prima volta in Grecia da campioni di feci appartenenti a due ragazzi talassemici.

Nel 1983, un'indagine retrospettiva condotta nei Paesi Bassi su 8 casi di meningite neonatale dovuta a *E. sakazakii*, verificatisi nei sei anni

precedenti, permise di stabilire che la malattia aveva un indice di mortalità molto alto (75%); i ceppi erano sensibili al trattamento con betalattamici piuttosto che a quello con l'ampicillina e la trasmissione dell'infezioni nella maggior parte dei casi era avvenuta attraverso il canale del parto (Muytjens *et al.*, 1983).

Luogo	Anno	Numero di casi (decessi)	Sorgente implicata
CASI SPORADICI			
USA	1981	1 (0)	Sconosciuta
Grecia	1982	2 (0)	Feci
Paesi Bassi	1983	1 (1)	Latte in polvere per l'infanzia
Canada	1990	2 (0)	Sconosciuta
Israele	1999-2000	2 (0)	Miscelatore
Belgio	2002	1 (1)	Latte in polvere per l'infanzia
EPIDEMIE			
Paesi Bassi	1983	8 (6)	Canale del parto
Grecia	1984	11 (4)	Sconosciuta
USA	1988	4 (0)	Latte in polvere per l'infanzia
Islanda	1986-1987	3 (1)	Latte in polvere per l'infanzia
Canada	1990	2 (?)	Sconosciuta
Belgio	1998	12 (2)	Latte in polvere per l'infanzia
USA	2001	10 (1)	Latte in polvere per l'infanzia
Israele	2002	5 (0)	Miscelatore

Tabella 10: Casi sporadici ed epidemici di infezioni neonatali nel mondo

Alla fine del 1984, un'altra epidemia da *E. sakazakii* segnalata in Grecia, nella quale rimasero coinvolti 11 neonati, contribuì a fare includere *E. sakazakii* nella lista delle specie microbiche da ricercare in occasione di infezioni da germi Gram negativi, anche se non permise di identificare la sorgente e le modalità di diffusione del microrganismo (Arseni *et al.*, 1987).

Tra il 1986 e il 1987, tre casi di infezione neonatale da *E. sakazakii* verificatisi in Islanda permisero di associare l'infezione al consumo di latte in polvere contaminato usato nell'ospedale. Studi condotti con tecniche di

biologia molecolare dimostrarono che il ceppo isolato dal latte era identico a quello isolato dai pazienti (Biering *et al.*, 1989).

Nel 1988 un'epidemia verificatasi nel Reparto di Pediatria dell'Ospedale di Memphis, Tennessee (USA), confermò che responsabile della sepsi era il latte in polvere contaminato (Simmons *et al.*, 1989).

Altri due casi di meningite neonatale causata da *E. sakazakii* si verificarono nel dicembre del 1990 in due ospedali canadesi (Nazarowec-Withe e Farber, 1997a).

Più recentemente, nel 1998, un'epidemia di enterocolite necrotizzante, caratterizzata da necrosi e pneumatosi intestinale, si verificò nel reparto di terapia intensiva neonatale di un ospedale belga. L'infezione che interessò 12 neonati, risultò fatale per due di loro. L'agente causale fu isolato dall'aspirato gastrico, dai tamponi rettali e dal sangue di sei dei dodici pazienti. I test di tipizzazione molecolare, hanno permesso di stabilire che il profilo genico dell'*E. sakazakii*, isolato dai campioni clinici, era sovrapponibile a quello del ceppo isolato dai campioni di latte in polvere usato per l'alimentazione dei neonati (Van Acker *et al.*, 2001).

Tra il dicembre 1999 e il gennaio 2000 due casi di infezione da *E. sakazakii* in due neonati pre-termine, alimentati con latte in polvere, sono stati segnalati da un ospedale pediatrico di Gerusalemme (Israele). Il microrganismo, però, non fu isolato dal latte, ma dal "miscelatore", usato per la sua ricostituzione, che risultò danneggiato. Il caso ha suscitato grande interesse nella comunità scientifica, perché l'infezione era stata causata da una variante biochimica del microrganismo (negativa al test dei nitrati generando profili API 20E atipici), resistente alla cefazolina, ma suscettibile a penicilline, cefalosporine, carbapenemici, fluorochinoloni, aminoglicosidi, tetracicline, trimetoprim-sulmetoxazolo, cloramfenicolo, e β -lattamasi positivo; ciò fece ipotizzare l'esistenza di diversi biotipi circolanti quali agenti infettanti (Block *et al.*, 2002).

Nell'aprile 2001 la presenza di *E. sakazakii* nel liquido cerebrospinale di un neonato prematuro e sottoposto a terapia intensiva in un ospedale pediatrico del Tennessee (USA) permise di scoprire che l'infezione era

diffusa anche tra i 49 neonati degenti dello stesso reparto (Baker, 2002). Furono identificati così 9 casi clinici: due di infezione sospetta (coltura *E. sakazakii*-positiva da siti non sterili traumatizzati, quale l'aspirato tracheale) e sette di soggetti colonizzati (coltura *Ent. sakazakii*-positiva da siti non sterili non traumatizzati, quali feci e urine). Tra i possibili fattori di rischio presi in considerazione per accertare le cause dell'infezione furono inclusi: l'età gestazionale, il peso alla nascita, l'incubatrice, il ventilatore, le medicazioni orali e il tipo di alimentazione (allattamento al seno, somministrazione di latte in polvere o liquido, alimentazione parenterale). Si accertò così che solo i campioni di latte in polvere prelevati sia da confezioni già aperte sia da quelle integre, dello stesso tipo di quello utilizzato per alimentare i neonati, erano contaminati da *E. sakazakii*; nessun campione ambientale (superfici di lavoro e acqua) risultò contaminato. Anche in questo caso, l'analisi molecolare confermò l'uguaglianza dei ceppi clinici e alimentari. In base a questi risultati, l'ospedale decise di sostituire la formula in polvere, maggiormente soggetta a manipolazione e, quindi, a contaminazione, con la formula liquida. Nel marzo 2002 la ditta produttrice della formulazione in polvere decise il ritiro del prodotto dal commercio.

Nel 2002 sono stati identificati altri 5 episodi di infezione da *E. sakazakii*, in un ospedale di Gerusalemme (Israele), con quadri clinici molto diversi: dall'infezione asintomatica, alla sepsi e all'infezione del sistema nervoso centrale. Ancora una volta la sorgente di contaminazione è risultata essere il "miscelatore" utilizzato per ricostituire il latte in polvere.

L'ultimo caso di infezione da *E. sakazakii*, trasmesso con il latte in polvere fino a oggi descritto, risale al marzo 2002 e ha interessato un neonato belga di 5 giorni nato a termine e in buone condizioni di salute, deceduto per meningite (CAC, 2003).

11 - VIRULENZA E DOSE INFETTANTE

I fattori di virulenza relativi alla patogenicità di *E. sakazakii* sono poco noti; alcuni ceppi producono sostanze simili a enterotossine o dimostrano un effetto citotossico. Tuttavia, tra i diversi ceppi studiati vi sono differenze sostanziali e alcuni sembrano privi di caratteristiche correlabili con la patogenicità.

È stato condotto uno studio sulla produzione di esotossine da parte di *E. sakazakii* in considerazione del fatto che l'infezione si contrae per via alimentare e il batterio è geneticamente correlato in maniera stretta con *E. cloacae*, di cui è nota la capacità di produrre esotossine. Le prove per la produzione di enterotossine sono state condotte su tre linee cellulari e su topini lattanti infettati per via orale e intraperitoneale; i 18 ceppi di *E. sakazakii* testati, a parte un ceppo ATCC, provenivano da latte in polvere e da campioni clinici. La totalità dei ceppi è risultata letale alla dose di 10^8 UFC per soggetto per via intraperitoneale, ma solo due ceppi sono risultati letali per via orale; inoltre 3 ceppi su 9 di origine clinica e uno su 8 di origine alimentare sono risultati in grado di produrre enterotossine. Ciò può essere spiegato ipotizzando un meccanismo di inattivazione a livello gastrico o intestinale, il che si accorda con la maggiore patogenicità dimostrata da questo batterio nei confronti di neonati, in particolare debilitati e/o prematuri (Pagotto et al. 2003).

Non si può comunque escludere che, essendo un microrganismo Gram negativo, la patogenicità sia dovuta alle endotossine, le componenti lipopolisaccaridiche della membrana cellulare, termoresistenti e responsabili di attività tossica, effetto pirogeno e danni all'apparato circolatorio (Duffy et al., 1997).

12 - METODICHE DI ISOLAMENTO DI *E. SAKAZAKII* NEGLI ALIMENTI

12. 1 - PROCEDURA FDA

Il metodo classico di isolamento di *E. sakazakii* indicato dalla Food and Drug Administration (CFSAN, 2002), prevede una fase di pre-arricchimento in acqua peptonata tamponata con incubazione *overnight* a 36°C, seguita da una fase di arricchimento in brodo EE (*Enterobacteriaceae Enrichment Broth*) incubato alle stesse condizioni. Successivamente viene effettuata la semina su *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBGA), da cui devono essere prelevate 5 colonie tipiche da trasferire su *Tryptone Soy Agar* (TSA), con incubazione a 25 °C per 48-72 ore per osservare la produzione di pigmento giallo. L'identificazione viene completata con l'esecuzione di prove biochimiche tramite sistemi miniaturizzati e di eventuali test addizionali come il saggio della produzione di DNasi extracellulare ritardata su Toluidine Blue Agar e della produzione di α -glucosidasi. Tale schema di isolamento è reso poco efficace dallo sviluppo contemporaneo di altre Enterobacteriaceae che possono impedire o mascherare quello di *E. sakazakii*. Ne consegue la possibilità di risultati falsi negativi (Iversen *et al.*, 2004a).

EE Broth (tabella 11) è un terreno liquido per la determinazione o enumerazione degli enterobatteri con la tecnica MPN o con il test Presenza/Assenza. Il terreno, contiene glucosio e permette quindi la crescita di tutti gli enterobatteri compresi i lattosio non fermentanti. Il terreno risulta essere selettivo per la presenza del verde brillante e dei sali biliari. Dopo aver incubato a 37° C per 20-24 ore nelle provette in cui si verifica torbidità, indice di crescita, si prosegue trasferendo un' ansata di brodocoltura su una piastra di VRBGA il quale sarà poi incubato a 37° C per 20-24 ore.

VRBGA (tabella 11) è un terreno selettivo e differenziale per l'isolamento ed il conteggio degli enterobatteri negli alimenti. Tale terreno presenta come carboidrato fermentabile il glucosio, per cui tutti gli enterobatteri coltivano con colonie rosse con o senza alone di precipitazione dei sali biliari che sono inibitori nei confronti dei batteri Gram positivi.

Le Enterobacteriaceae coltivano con colonie di diametro maggiore di 0,5 mm di colore rosso-viola con o senza alone rosso-viola.

FORMULA TIPICA (g/l)*¹		FORMULA TIPICA (g/l)*²	
PEPTONE	10,00	PEPTONE	7,00
BILE DI BUE	20,00	ESTRATTO DI LIEVITO	3,00
GLUCOSIO	5,00	SODIO COLORURO	5,00
SODIO FOSFATO BIBASICO	6,450	SALI BILIARI n° 3	1,50
POTASSIO FOSFATO MONOBASICO	2,00	GLUCOSIO	10,00
VERDE BRILLANTE	0,014	ROSSO NEUTRO	0,030
		VIOLETTO CRISTALLO	0,002
		AGAR	15,00

Tabella 11: composizione *EE Broth*¹ e *Violet Red Bile Glucose Agar*²

TSA (tabella 12) è un terreno d'uso generale che supporta la crescita di una larga varietà di microrganismi.

FORMULA TIPICA (g/l)	
IDROLISATO PANCREATICO DI CASEINA	15,00
PEPTONE DI SOIA	5,00
SODIO CLORURO	5,00
AGAR	15,00

Tabella 12: composizione *Tryptone Soy Agar*

Per le sue caratteristiche nutrizionali, per l'assenza di inibitori, per la possibilità di essere addizionato con i composti più svariati, il terreno si presenta bene per l'isolamento dei patogeni, per lo studio di microrganismi a crescita fastidiosa, per il mantenimento di ceppi di collezione, per procedure di fermentazione. TSA è comunemente usato per

il conteggio dei germi presenti nelle urine e negli espettorati ed in microbiologia alimentare per la conta dei microrganismi presenti nel latte, carni, alimenti conservati ecc.

12.2 - METODICA mLSTV/COMPASS

Una metodica di ricerca per *E. sakazakii* è stata messa appunto anche dalla norma ISO/TS 22964 (*Milk and milk products – Detection of Enterobacter sakazakii*), la quale prevede una fase di pre-arricchimento in acqua peptonata tamponata (BPW), come il metodo FDA, con incubazione a 37° C per 18 ore, seguita da una fase di arricchimento selettivo in mLST/vancomicina (incubazione a 44° C per 24 ore) e poi una semina per isolamento in agar cromogenico. Poiché le colonie tipiche che crescono sul terreno sono presunte *E. sakazakii* è necessario procedere con la conferma della produzione di pigmento giallo su TSA. A questo punto le colonie che danno pigmento giallo devono essere confermate con prove biochimiche.

E. sakazakii forma colonie di colore giallo brillante a 25° C per 48 ore o una patina di colonie gialle a 37° C con un diametro di 1-3 mm. Queste colonie sono lisce, di consistenza mucosa o secca.

Modified Laurylsulfate – Tryptose Vancomycin Broth (mLST/V) è un brodo selettivo utilizzato per la ricerca di *E. sakazakii* nel latte e nei prodotti lattiero-caseari. Dopo incubazione a 44 °C per 24 ore si prosegue con l'isolamento inoculando per semina superficiale una piastra di *COMPASS Enterobacter sakazakii Agar* (tabella 13).

Tale terreno agarizzato è stato messo a punto in seguito a studi che hanno dimostrato che il 100% di *E. sakazakii* è α-glucosidasi positivo, mentre il 100% delle altre specie del genere *Enterobacter* non produce questo enzima. Sulla base di queste osservazioni, è stato proposto il substrato cromogenico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-glucopiranoside (X-α-

glucoside) per differenziare *E. sakazakii* dagli altri membri della famiglia delle Enterobacteriaceae (Iversen et al. 2004; Guillaume-Gentil et al., 2005). L'enzima α -glucosidasi idrolizza l' X - α -glucoside, con liberazione dell'aglicone 5-bromo-4-cloro-indololo. In presenza di ossigeno, l'aglicone è dimerizzato e forma il pigmento bromo-cloro-indigo di colore blu indaco.

Il brodo selettivo il sodio lauril-solfato, associato con vancomicina, e l'alto contenuto di sodio cloruro, impediscono lo sviluppo della maggior parte della flora secondaria contaminante; inoltre, in virtù dell'eccellente fertilità, così come la presenza di fosfati ad azione tampone, mLST/V favorisce un rapido sviluppo di *E. sakazakii* anche se presenti in numero esiguo.

FORMULA TIPICA (g/l) ^{*1}		FORMULA TIPICA (g/l) ^{*2}	
TRIPTOSIO	20,00	TRIPTONE	7,00
LATTOSIO	5,00	ESTRATTO DI LIEVITO	3,00
DIPOTASSIO FOSFATO	2,75	SODIO CLORURO	5,00
MONOPOTASSIO FOSFATO	2,75	SODIO DESSOSSICOLATO	0,60
SODIO CLORURO	34,00	CRISTALVIOLETTO	0,002
SODIO LAURI-LSOLFATO	0,10	5-BROMO-4-CLORO-3-INDOLIL- α -D-GLUCOPIRANOSIDE	0,150
VANCOMICINA	0,01	AGAR	14,40

Tabella 13: composizione mLSTV¹/COMPASS *E.sakazakii* Agar²

Per quanto riguarda il terreno agarizzato possiamo definire che il triptone favorisce la crescita dei microrganismi appartenenti al genere *Enterobacter* e la scelta della temperatura di incubazione a 44° C, associata al sodio deossicolato e cristal-violetto, contribuisce all'inibizione della flora di fondo.

X- α -glucoside assicura la rilevazione cromogenica dell'attività α -glucosidasica di *E. sakazakii*.

Data la necessità di eseguire ricerche su vasta scala riguardo alla presenza di questo microrganismo in prodotti industriali, quale appunto il latte formulato in polvere per neonati, sono stati messi a punto anche altri metodi di isolamento più efficaci e rapidi.

12.3 - METODICA CON UV

Leuschner e coll. (2004) hanno sviluppato un terreno differenziale per l'isolamento di *E. sakazakii* basato sulla presenza dell'enzima α -glucosidasi. Il terreno è caratterizzato dall'aggiunta al Nutrient Agar standard di un substrato per il suddetto enzima, il 4-metil-umbelliferil- α -D glucoside, la cui metabolizzazione da parte del germe determina la formazione di un prodotto fluorescente a luce UV, per cui *E. sakazakii* sviluppa con formazione di colonie pigmentate di giallo e fluorescenti alla luce UV. Per l'isolamento di *E. sakazakii* da campioni di alimenti, il metodo prevede comunque una fase di pre-arricchimento e una di arricchimento selettivo come nel metodo classico.

12.4 - METODO DFI

Il terreno, chiamato DFI dalle iniziali dei tre ricercatori, Druggan, Iversen e Forsythe, prodotto commercialmente, rappresenta una valida alternativa al metodo classico su VRBGA e TSA, permettendo di individuare la presenza del microrganismo in tempi inferiori di due giorni, dal momento che il periodo di incubazione necessario è di 24 ore contro le 48-72 ore necessarie a dare pigmentazione gialla su TSA.

Iversen e Forsythe (2004) hanno inoltre dimostrato che rispetto al metodo convenzionale l'utilizzo del terreno DFI ridurrebbe la possibilità di falsi negativi, soprattutto per quanto riguarda la ricerca di *E. sakazakii* in alimenti in polvere.

12.5 - METODO ESSB/ESIA

Consente la ricerca specifica di *E. sakazakii* nei campioni alimentari e in particolare nel latte in polvere o in prodotti preparati con latte in polvere.

Enterobacter Sakazakii Selective Broth (ESSB) è un brodo selettivo che consente l'arricchimento nel campione di bastoncini Gram negativi e in particolare di *Enterobacter* spp. vista la composizione del brodo l'azione selettiva è esercitata da una miscela di inibitori.

Enterobacter Sakazakii Isolation Agar (ESIA) è un terreno selettivo per Gram negativi contenente un composto cromogenico per la differenziazione di *Enterobacter sakazakii* che coltiva con colonie blu (tabella 14).

FORMULA TIPICA (g/l) ^{*1}		FORMULA TIPICA (g/l) ^{*2}	
PEPTONI	20,00	PEPTONE	7,00
LATTOSIO	5,00	ESTRATTO DI LIEVITO	3,00
MISCELA DI INIBITORI	25,40	SODIO CLORURO	5,00
TAMPONE FOSFATO	5,50	SODIO DESOSSICOLATO	0,60
		VIOLETTO CRISTALLO	0,002
		X- α -GLUCOSIDE	0,150
		AGAR	15,00

Tabella 14: composizione ESSB¹ e ESIA²

Si procede con l'aggiunta di 25g di campione a 225 ml di ESSB il quale viene incubato a 37 °C per 24 ore dopo di che facendo uso di un'ansa viene trapiantato del brodo su una piastra di ESIA a sua volta incubata per 21 ore a 44 °C. Sul terreno agarizzato il presuntivo risultato positivo è rappresentato da colonie tipiche color blu mentre il risultato negativo è dato dall'assenza di colonie tipiche blu o la presenza di colonie color malva. È comunque necessario confermare le colonie tipiche con test biochimici standard per Enterobacteriaceae.

Non vanno dimenticati altri metodi di analisi per campioni ambientali oltre ad altri di impronta molecolare come Metodo PFGE (Nazarowek *et al.*, 1999), Metodo RAPD-PCR (Clementino *et al.*, 2001) Metodo ribotipizzazione (Bruce, 1996) Metodo BAX (The Du Pont Qualicon, 2004).

13 - OBIETTIVI DELLA TESI

Gli obiettivi della tesi sono quelli di:

1. Valutare i diversi metodi di isolamento e la loro sensibilità per la ricerca di *E. sakazakii*, così come riportati dalla ISO/TS 22964 e altri individuati a livello bibliografico, per poi utilizzare la metodica che si comporta meglio in alimenti dove possono essere presenti anche microrganismi interferenti.
2. Analizzare gli alimenti destinati all'infanzia concentrando l'attenzione sulla ricerca di Enterobacteriaceae. Valutando:
 - a. qualità microbiologica dei prodotti per l'infanzia, utilizzando le metodiche analitiche di cui al punto 1;
 - b. le caratteristiche intrinseche dei prodotti che possono favorire oppure ostacolare lo sviluppo di *E. sakazakii*.
3. Influenza delle diverse temperature di ricostituzione del latte in polvere su *E. sakazakii*.

13.1 - MATERIALI E METODI

Prima di effettuare l'analisi sui prodotti per l'infanzia si è proceduto a una verifica per definire quale terreno culturale fosse migliore per l'isolamento di *E. sakazakii* viste le numerose procedure proposte dalle norme e dalla bibliografia. Lo stesso studio sull'influenza delle diverse temperature di ricostituzione del latte in polvere ha richiesto un'analisi precedente in termini di sensibilità dei diversi metodi di ricerca di *E. sakazakii*.

Quindi materiali e metodi li troviamo divisi in quattro punti principali:

- studio del microrganismo sui diversi terreni di coltura
- analisi dei prodotti per l'infanzia
- sensibilità delle procedure di ricerca per la ricerca del microrganismo
- influenza delle temperature di ricostituzione del latte in polvere su *E. sakazakii*.

13.1.1 - STUDIO DEL MICRORGANISMO SUI DIVERSI TERRENI DI COLTURA

13.1.1.1 - MATERIALI

Lo studio è stato condotto con *E. sakazakii* in solitario e in presenza di microrganismi interferenti testati su una serie di terreni comunemente utilizzati in ambito microbiologico (TSA, VRBGA, McC, HEA, XLT4) e altri specifici per *E. sakazakii* (COMPASS, ESIA e DFI).

L'inoculo utilizzato per la crescita in solitario è rappresentato dal ceppo *Enterobacter sakazakii* ATCC 29544.

La crescita con i diversi microrganismi interferenti è stata attuata prendendo in considerazione una serie di *Enterobacteriacee* e più precisamente: *Enterobacter aerogenes*, *Providencia rettgeri*, *Hafnia alvei*, *Escherichia coli*, *Morganella morgani*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella*, *Escherichia wulneris* e *Proteus mirabilis*.

Per quanto concerne i terreni non contenuti nelle metodiche abbiamo preso in considerazione la crescita in *Mac Conkey Agar* (McC), *Hektoen Enteric Agar* (HEA) e XLT₄.

McC agar è un terreno selettivo e differenziale per l'isolamento e la differenziazione degli enterobatteri e dei coliformi dagli enterobatteri patogeni non fermentanti il lattosio.

L'azione selettiva del *Mac Conkey Agar* (tabella 15) è dovuta alla presenza dei sali biliari n. 3 che inibiscono la crescita dei batteri Gram positivi; l'attività inibitoria è potenziata dall'aggiunta di cristal-violetto.

La fermentazione del lattosio da parte dei coliformi provoca un'acidificazione del mezzo e una conseguente precipitazione dei sali biliari con assorbimento del rosso neutro. I coliformi coltivano, quindi, con colonie rosso-viola circondate da un alone di precipitazione, i

microrganismi lattosio non fermentanti coltivano con colonie prive di colore. La sciamatura dei protei è controllata su *Mac Conkey Agar* grazie all'impiego di peptoni rigorosamente selezionati e di sali biliari estremamente purificati che agiscono da inibitori di tale fenomeno.

FORMULA TIPICA (g/l)	
PEPTONE DI GELATINA	17,00
PEPTOCOMPLEX	3,00
LATTOSIO	10,00
SALI BILIARI N. 3	1,5
SODIO CLORURO	5,00
ROSSO NEUTRO	0,03
VIOLETTO CRISTALLO	0,001
AGAR	13,50

Tabella 15: Composizione Mac Conkey Agar

Hektoen Enteric Agar (tabella16) è un terreno selettivo per l'isolamento e la differenziazione della flora intestinale Gram negativa, preparato secondo la formula di King e Metzger.

FORMULA TIPICA (g/l)	
TRIPTOSIO	12,00
ESTRATTO DI LIEVITO	3,00
SALI BILIARI n° 3	9,00
LATTOSIO	12,00
SACCAROSIO	12,00
SALICINA	2,00
SODIO CLORURO	5,00
SODIO TIOSOLFATO	5,00
Fe-AMMONIO CITRATO	1,50
AGAR	15,00
BLU DI BROMOTIMOLO	0,065
FUXINA ACIDA	0,10

Tabella 16: Composizione *Hektoen Enteric Agar*

Il terreno contiene, oltre a una miscela di peptoni, lattosio, saccarosio e salicina; indicatori di pH quali blu bromotimolo e fucsina acida; agenti selettivi come sali biliari n° 3; indicatori di H₂S costituiti da sodio tiosolfato e ferro (ico) ammonio citrato così permette di distinguere facilmente la flora che fermenta lattosio, saccarosio e salicina, da quella che non fermenta tali zuccheri.

XLT₄ Agar è un terreno selettivo e differenziale usato per l'isolamento degli enterobatteri patogeni e soprattutto per la determinazione qualitativa di *Salmonella non typhi* spp. negli alimenti.

Su XLT₄ Agar si ottiene una differenziazione degli enterobatteri sulla base della fermentazione di xilosio, decarbossilazione della lisina e produzione di idrogeno solforato a partire dal sodio tiosolfato.

Il Tergitol 4 inibisce la crescita dei microrganismi Gram positivi e di molti Gram negativi, il rosso fenolo è presente come indicatore di pH, il ferro ammonio citrato come indicatore della produzione di idrogeno solforato.

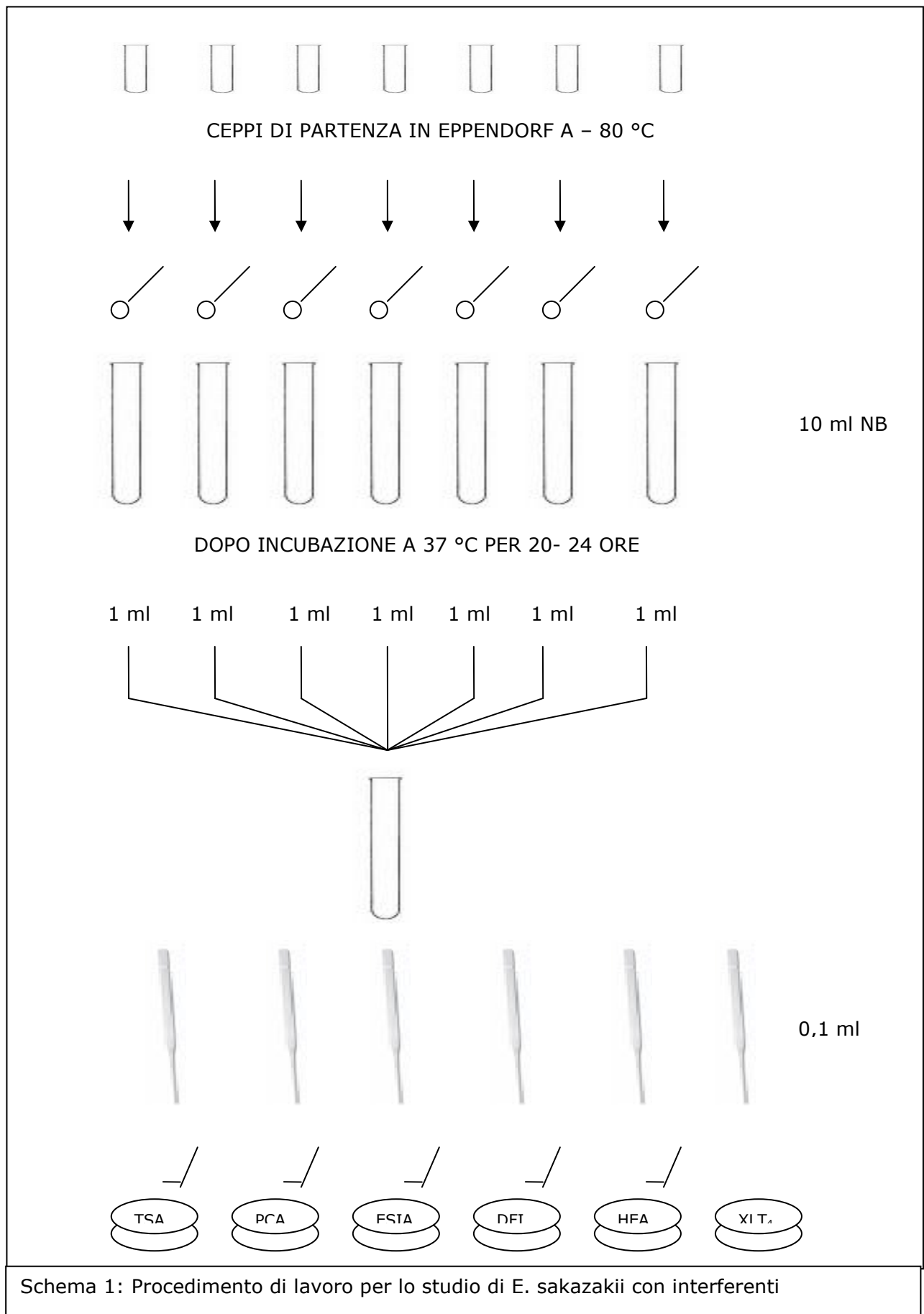
Salmonella fermenta lo xilosio con acidificazione del mezzo e decarbossila la lisina con conseguente inversione del pH del terreno a valori alcalini; ad eccezione di alcune specie H₂S negative, *Salmonella* possiede anche l'attività tiosolfato reduttasica, quindi su XLD coltiva con colonie rosse con centro nero, per la precipitazione del ferro solfuro. *Shigella* è H₂S negativa e non fermenta gli zuccheri presenti nel terreno e coltiva con colonie incolori. Gli organismi lisina-decarbossilasi negativi e positivi a uno degli zuccheri presenti nel terreno producono colonie gialle (*E.coli*, *Citrobacter*, *Proteus*).

13.1.1.2 - METODI

Lo studio riguardo a *E. sakazakii* in solitario è stato condotto stemperando una colonia di ceppo puro in 9 ml di Nutrient Broth (NB) per 18-20 ore a

37°C dopo di che si è proceduto con l'inoculo sui rispettivi terreni agarizzati servendosi di un'ansa sterile.

Per quanto riguarda la crescita in presenza di interferenti questi sono stati presi dalla ceppoteca a - 80 °C. Mediante ansa sterile si è riportata una piccola quantità di ceppo microbico in NB e una volta ottenuta la crescita, evidenziata dalla presenza di torbidità, sono stati introdotti volumi uguali del brodo di crescita all'interno di una provetta sterile (schema 1). Una volta creato il pool



microbico si è proseguito con la semina sui diversi terreni. I terreni una volta seminati sono stati incubati alle temperature indicate nella scheda tecnica (tabella 17), tranne per alcune eccezioni (DFI, TSA, VRBGA), mentre le letture sono state effettuate a 15, 20, 24, 36, 48 ore in modo da valutare l'andamento e le caratteristiche della crescita nel tempo.

Terreno	25 °C	37 °C	44 °C
TSA	•		•
XLT4		•	
PCA	•	•	
COMPASS			•
ESIA			•
DFI		•	•
HEA		•	
McC		•	
VRBGA		•	•
EE Broth		•	
ESSB			•
mLSTV/V			•

Tabella 17: Temperature incubazione dei terreni in analisi

13.1.2 - ANALISI DEI PRODOTTI PER L'INFANZIA

13.1.2.1- MATERIALI

Sono stati analizzati 47 campioni di prodotti per l'infanzia acquistati in supermercati, ipermercati e in farmacia.

In particolare, sono stati analizzati: 17 latti formulati in polvere, 15 pappe che sono assunte a partire dal 4° o 6° mese di età, 6 omogeneizzati e 7 prodotti di latte condensato e concentrato.

La maggior parte dei prodotti analizzati sono stati acquistati nei supermercati mentre in alcuni casi si trattava di prodotti scaduti e con le confezioni aperte. Alcuni di questi prodotti erano appartenenti alla categoria dei latti speciali in quanto destinati a fini medici speciali.

Com'è possibile notare dalla tabella 18 a-b i latti in polvere si presentano sottoforma di due tipologie: una suddivisa in più sacchetti contenuti all'interno di una scatola cartonata con un contenuto totale di 800-900g, oppure, un unico contenitore in alluminio con film a strappo che consente la chiusura definitiva supportato da un coperchio in plastica che consente la protezione del prodotto una volta aperto. Ogni sacchetto, in alluminio, riportava indicazioni identificative del prodotto quali la data di scadenza e il lotto di produzione. All'interno della quasi totalità delle confezioni di c'era un misurino di dimensioni e conformazioni variabili.

Per quanto riguarda le pappe, invece, erano quasi esclusivamente contenute in un' unico sacchetto e in nessun caso è stato trovato un dosatore.

I prodotti sono stati sottoposti alla ricerca di microrganismi sia in termini quantitativi che qualitativi tenendo presente anche le indicazioni definite dal Reg. CE 2073/2005 e sue modifiche.

I prodotti acquistati sono stati sottoposti a un'analisi qualitativa per la ricerca di *E. sakazakii*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. e quantitativa in termini di enterobatteri totali, Carica microbica totale

(CMT), coliformi totali, lieviti e muffe, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. e batteri lattici. Tutti i prodotti sono stati poi anche sottoposti alla ricerca dei parametri chimico-fisici (A_w e pH).

N° campione	Tipologia di prodotto					Provenienza			Dettagli		
	Latte per lattanti	Latte proseguimento	Pappe	Omogeneizzati	Altro	Ipermercato	Supermercato	Farmacia	Contenuto (gr)	N° sacchetti	Presenza cucchiaino
959		•					•		800	2	•
960		•				•			900	0	•
961			•			•			250	0	
962			•				•		220	0	
986			•			•			250	1	
987	•					•			900	1	•
1009		•					•		600	2	•
1011			•				•		200	1	
1012			•				•		220	1	
1013				•			•		90	0	
1014				•			•		90	0	
1019			•			•			250	1	
1020			•			•			200	1	
1021			•			•			250	1	
1022			•			•			250	1	
1026			•			•			220	1	
1051	•							•	250	1	•
1052			•					•	250	0	
1053			•					•	200	1	
1054	•							•	200	1	•
1056	•					•			250	1	•
1135			•					•	200	1	
1136			•					•	200	1	

Tabella 18 a: Alcune caratteristiche dei prodotti presi in analisi

continua...

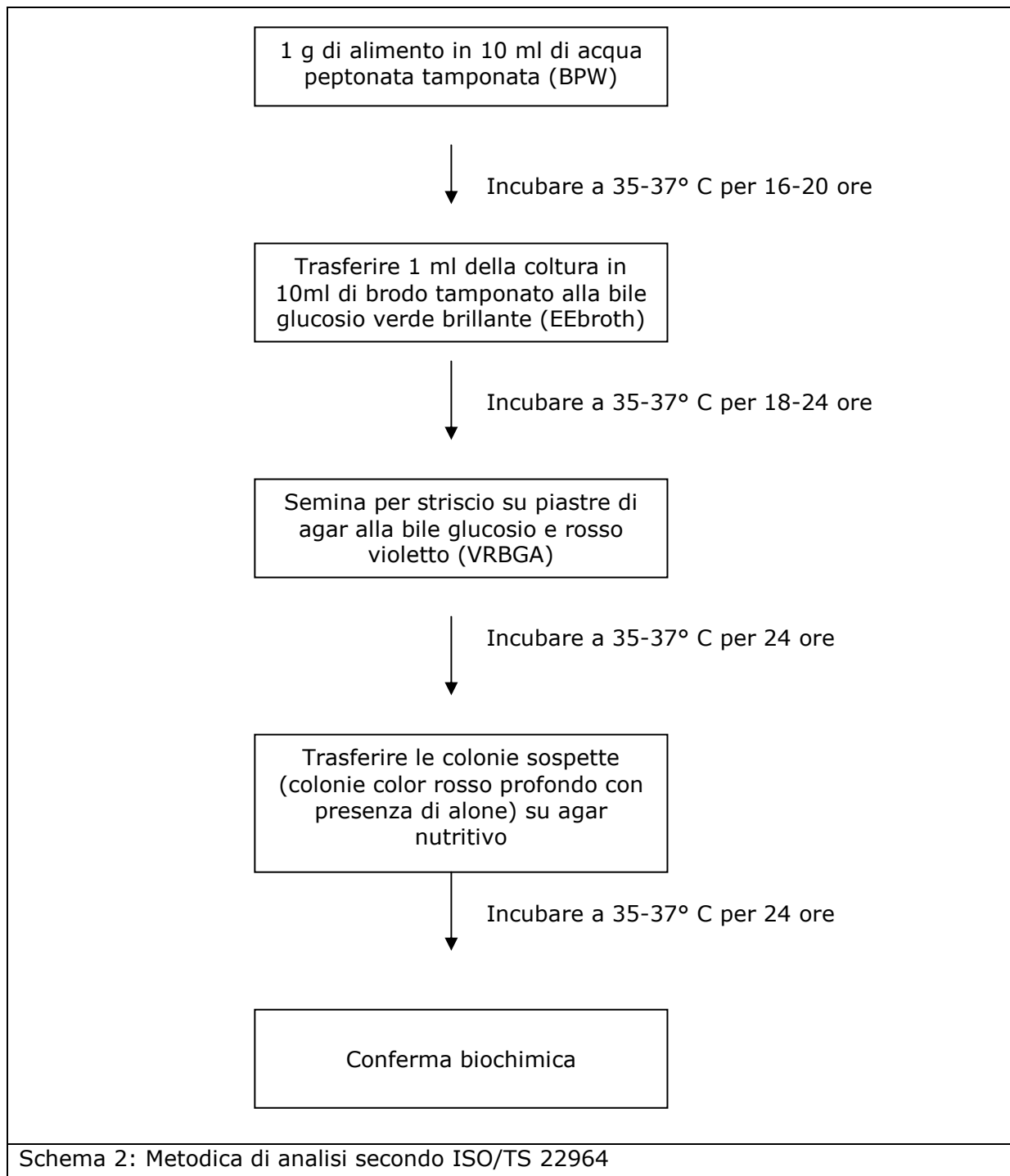
N° campione	Tipologia di prodotto					Provenienza			Dettagli		
	Latte per lattanti	Latte proseguimento	Pappe	Omogeneizzati	Altro	Ipermercato	Supermercato	Farmacia	Contenuto (gr)	N° sacchetti	Presenza cucchiaino
1149						•			800	2	•
1150	•					•			900	3	•
1151				•			•		90		
1157			•					•	200	1	
1158	•						•		800	2	•
1159		•						•	900	3	•
1161				•			•		90		
1162				•			•		90		
1163				•			•		90		
1164					•		•		200	0	
1225		•					•*		400	0	
1226		•					•*		400	0	
1227					•		•*		400	0	
1228					•		•*		400	0	
1229					•		•*		400	0	
1230	•						•*		400	0	
1231					•		•*		200	0	
1232					•		•*		400	0	
1233					•		•*		200	0	
1234	•					•			900	3	•
1235		•				•			900	3	•
1236	•					•			1050	3	•
1237		•				•			1050	3	•

* prodotti acquistati in negozi cinesi

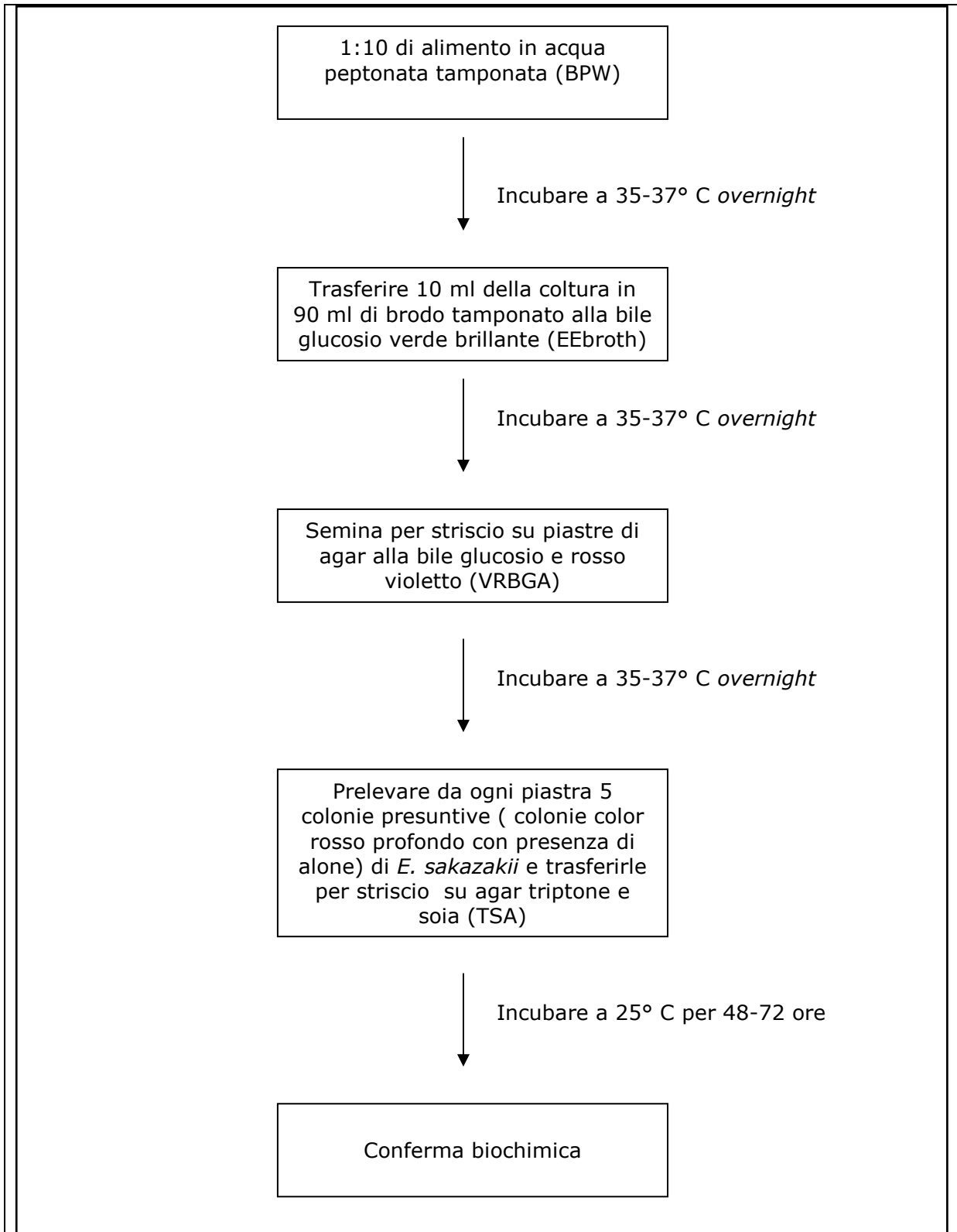
Tabella 18b: Caratteristiche dei prodotti analizzati

13.1.2.2 - METODI

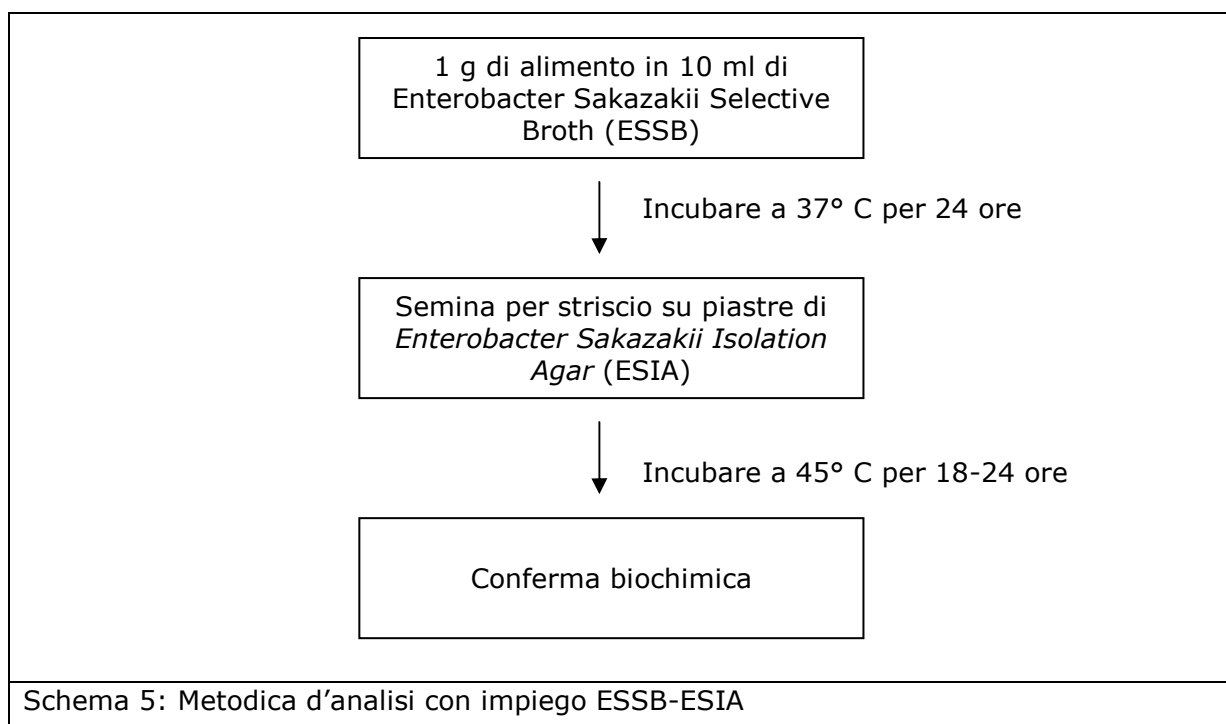
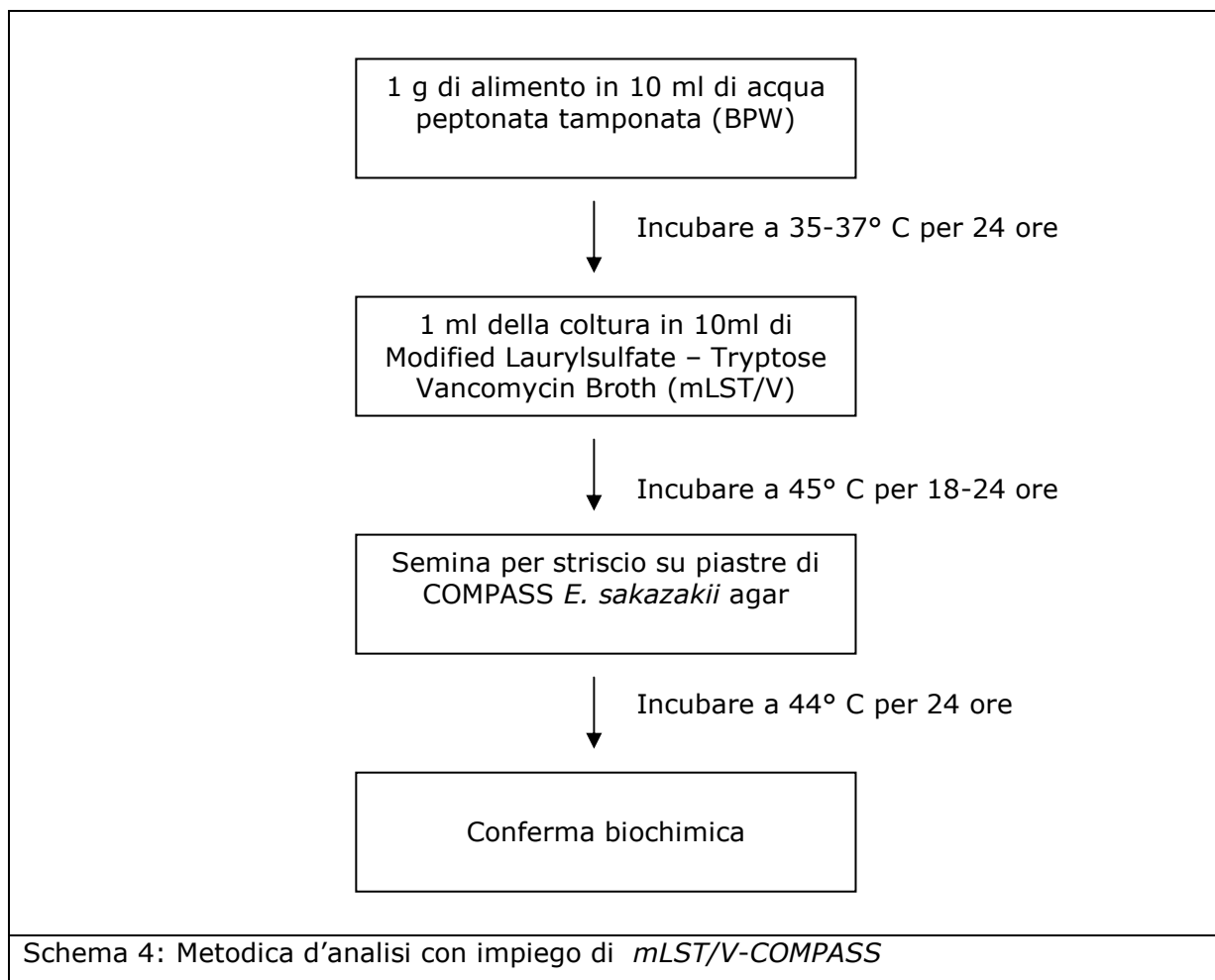
La ricerca di *E. sakazakii* attuata a livello quantitativo è stata eseguita prendendo in considerazione le procedure definite dalla norma ISO/TS 22964 e altre metodiche certificate e non, come citate a livello bibliografico.



Schema 2: Metodica di analisi secondo ISO/TS 22964



Schema 3: Metodica d'analisi FDA (*Food and Drug Administration*)



La ricerca di *Salmonella* si è eseguita secondo la norma ISO 6579 (Schema 6).

La ricerca quantitativa di *Listeria monocytogenes* è stata effettuata, seguendo la metodica ISO 11290-2, ponendo 25 g di alimento in 225 di Fraser Broth o di acqua peptonata dopo di che si è incubato per un'ora a temperatura ambiente per poi inoculare 0.1 ml di sospensione per spatolamento su ALOA incubato poi a 37°C per 24 ore.

L'analisi quantitativa è stata eseguita ponendo 20 g di campione in 180 ml di soluzione fisiologica sterile. Successivamente il campione è stato inoculato per spatolamento o per inclusione nei diversi terreni di coltura incubati a adeguate temperature a seconda del microrganismo d'interesse (tabella 19).

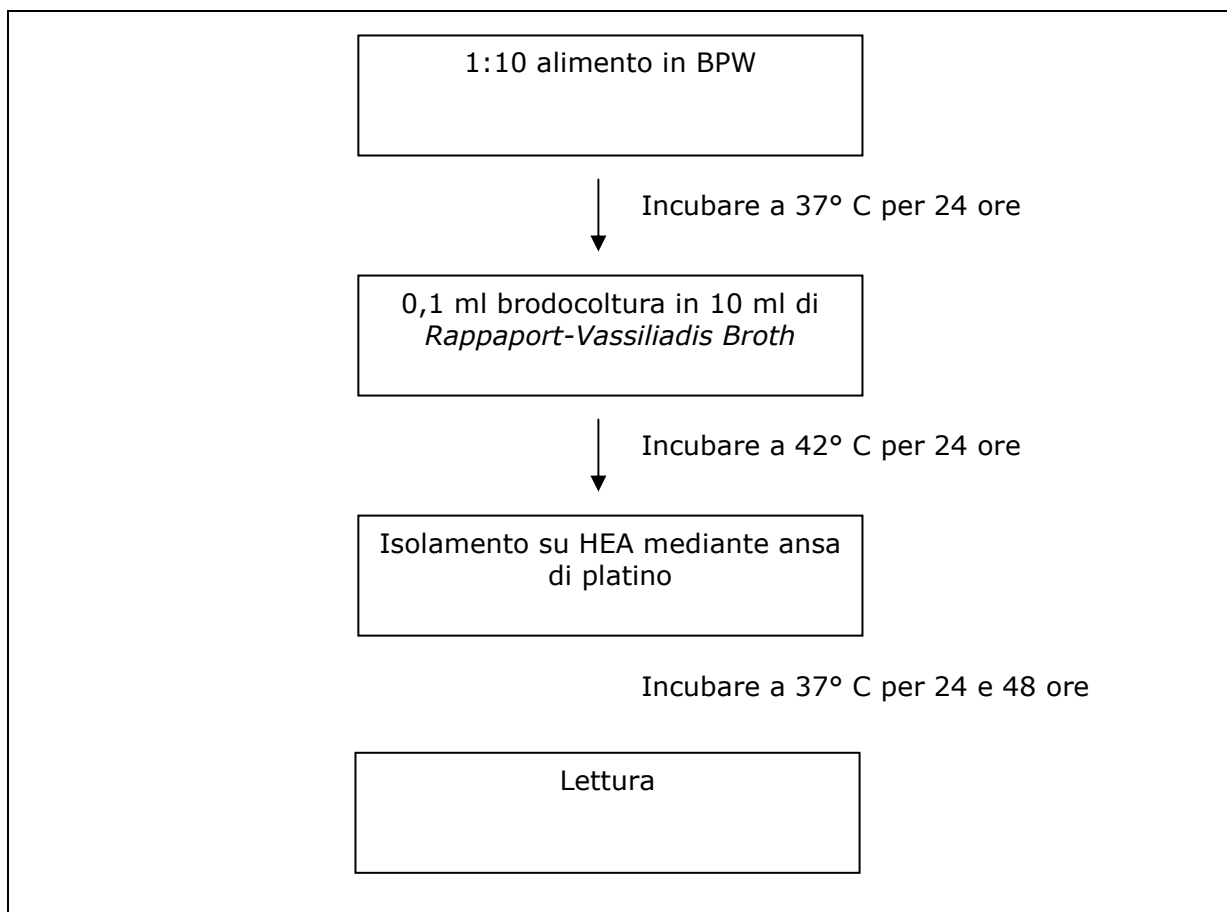
Parametro	Terreno	Temperatura	Tempi
CMT	PCA	31° C	24 – 48 ore
Enterobatteri	VRBGA	37° C	24 ore
Coliformi totali	MacConkey	37° C	24° C
Lieviti e muffe	OGA ^{*1}	21° C	48 ore
<i>Pseudomonas</i>	GSP ^{*2}	21° C	48 ore
<i>Aeromonas</i>	GSP	21° C	48 ore
<i>Lactobacillus</i> spp.	MRS ^{*3}	37° C	2- 3 gg ^{*4}
<i>Bacillus cereus</i>	BC	31° C	24 ore

^{*1,2,3} Scheda tecnica in allegato

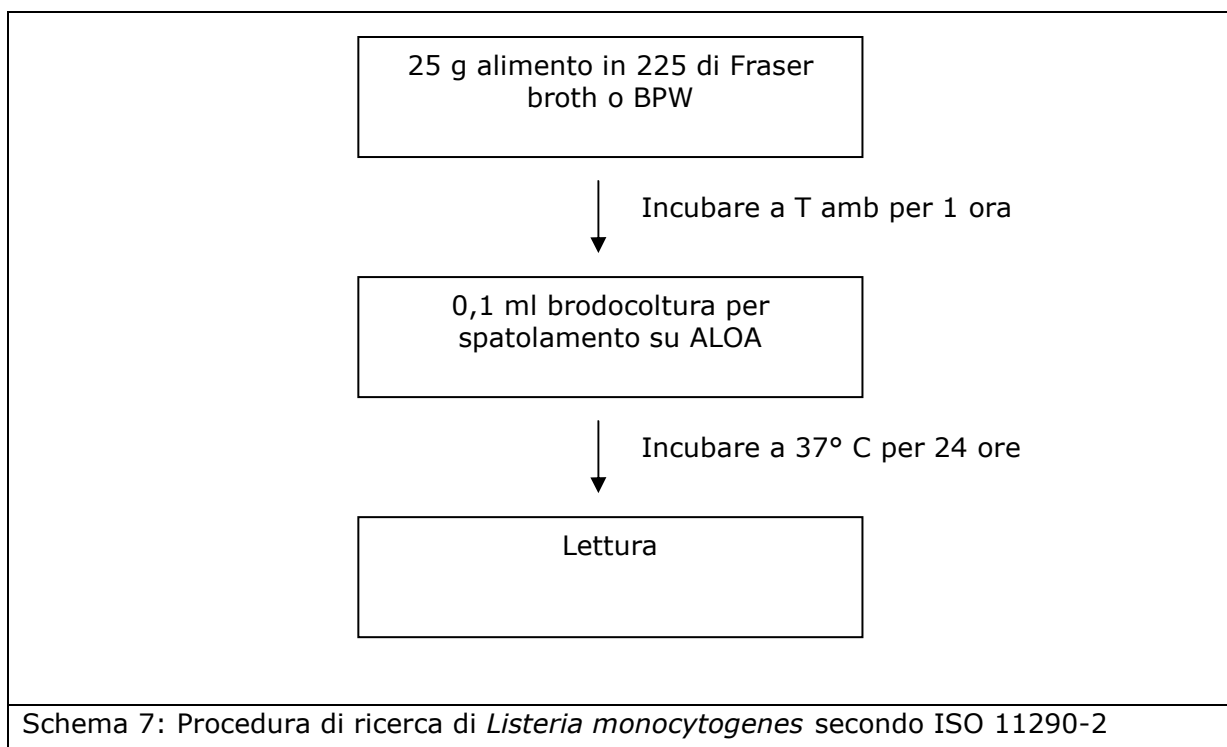
^{*4} le piastre inoculate vanno collocate in una giara per anaerobiosi

Tabella 19: Terreni e parametri d' inoculo per la ricerca di microrganismi quantitativamente

Per quanto riguarda la ricerca dei parametri chimico-fisici ci si è serviti della strumentazione specifica.



Schema 6: Procedura di ricerca di *Salmonella* secondo ISO 6579



Schema 7: Procedura di ricerca di *Listeria monocytogenes* secondo ISO 11290-2

La determinazione dell' a_w è stata eseguita mediante l'impiego dell'AquaLab (Model CX2) il quale grazie all'inserimento del prodotto nel contenitore una volta posto nell'apposito spazio permette di rilevare in qualche minuto il valore sul display (Foto 2).

La determinazione del pH è stata valutata mediante l'ausilio del pHmetro (pHmeterbasic 20), prima di essere impiegato nella lettura deve essere correttamente tarato utilizzando le soluzioni a pH 4 e 7 (Foto 3).

L'elettrodo, che consente la rilevazione del valore di pH viene inserito nel campione preventivamente preparato aggiungendo 16 g di campione a 32 ml di soluzione fisiologica. Il valore recepito viene trasmesso sul display.



Foto 2: AquaLabModel CX2



Foto 3:pHmeterbasic 20

13.1.3 - SENSIBILITÀ DELLE PROCEDURE DI RICERCA PER L'ISOLAMENTO DEL MICRORGANISMO

13.1.3.1- MATERIALI

Sono state fatte una serie di prove riguardo alla possibile sensibilità che possono avere, in termini di identificazione di *E. sakazakii*, i differenti metodi di ricerca.

Lo studio ha previsto due possibilità di svolgimento:

- una prima rappresentata da una miscela di vari generi microbici, come era già stata preparata per la prova nei terreni, in cui i vari ceppi microbici dopo essere stati rivitalizzati singolarmente in BHI erano miscelati insieme;
- una seconda, che si potrebbe definire "in vivo", in cui si è scelta una matrice alimentare che contiene naturalmente una flora microbica composita.

La scelta, poi, si è indirizzata su quest'ultima, in quanto più facilmente rappresentativa di quello che è presente in natura.

Sono, quindi, state fatte diverse prove per individuare quella matrice alimentare che poteva essere utilizzata allo scopo sopra riportato: si sono impiegati dapprima gli scarafaggi, in quanto ritenuti insetti particolarmente inquinati per la numerosa flora microbica che possiedono sia sul corpo che nell'intestino e che si possono tra l'altro trovare nell'ambiente sia domestico che ospedaliero; poi, l'attenzione si è rivolta al latte crudo, matrice più facilmente utilizzabile anche per fare gli inoculi essendo allo stato liquido.

Prima di dare inizio alla prova sono state necessarie una serie di analisi che hanno consentito la messa a punto di una procedura standardizzata in modo da consentire una certa conoscenza nell'attuazione dell'inoculo.

13.1.3.2 - METODI

A tale riguardo si è proceduto effettuando un prelievo da una cultura di *E. sakazakii* con un'ansa sterile e si è seminato in un comune brodo, Nutrient Broth che non presenta alcuna selettività. Dopo un'incubazione a 37 °C di qualche ora si è proseguito con le diluizioni seriali e la semina di 0,1 ml di brodocoltura in terreno cromogenico per *E. sakazakii* in modo da attuare un'indagine quantitativa. Dopo un'opportuna incubazione a 44° C si è proseguito con la conta.

Al termine di una serie di prove è stato possibile definire una proporzione tra la diluizione e la concentrazione microbica pari a quella riportata in tabella.

DILUIZIONE	COLONIE
10^{-4}	> 300
10^{-5}	120 - 150
10^{-6}	12 - 15
10^{-7}	1 - 2

Il latte crudo una volta giunto in laboratorio è stato diviso in diverse aliquote da 100 ml. A questo punto si è proceduto con l'inoculo, prendendo come riferimento lo schema di standardizzazione.

Inoculo (ufc/ml)
< 1
1.5
1.8
15
> 30

Le metodiche di isolamento utilizzate sono state quelle che prevedono l'impiego dei brodi d'arricchimento ESSB e mLSTV e i relativi terreni cromogenici ESIA e COMPASS *E. sakazakii* Agar. Le procedure è sono state eseguite nella loro integrità e sono stati fatti anche passaggi diretti su terreno cromogenico prima del passaggio in brodo d'arricchimento. Parallelamente all' inoculo è stata eseguita una semina per il controllo.

13.1.4 - INFLUENZA DELLE TEMPERATURE DI RICOSTITUZIONE DEL LATTE IN POLVERE SU *E. sakazakii*

13.1.4.1- MATERIALI

Tale studio è stato effettuato con lo scopo di valutare il comportamento di *E. sakazakii* nel latte in polvere destinato al consumo come alimento per neonati e infanti. Tale matrice eterogenea, costituita da una componente chimica complessa ad alto valore biologico e per le sue caratteristiche chimico fisiche decisamente favorevoli, rappresentano un buon substrato per lo sviluppo microbico qualora il latte sia contaminato durante la sua ricostituzione in ambito familiare e ospedaliero.

La messa appunto del procedimento di analisi è stata fatta considerando uno studio effettuato da Suhad Sanjaq et al., (2006) riguardo a "metodologia e quantità di inoculo in latte in polvere".

Prima di definire i livelli d'inoculo è importante ricordare che la breve *shelf life* del latte ricostituito e la sua componente biologica senza inibitori naturali, fanno sì che le cariche non possono far altro che aumentare e, quindi, sarà ragionevole effettuare un'inoculo con bassa carica infettante; nonostante ciò è fondamentale prendere in considerazione anche le temperature di stoccaggio.

13.1.4.2- METODI

Ci si è serviti di una serie di bottiglie sterili all'interno delle quali vi è stata posta una quantità di polvere necessaria per ricostituire 200 ml di prodotto. La polvere è stata contaminata all'interno delle bottiglie con quantitativi crescenti di *E. sakazakii* prendendo in considerazione la proporzione tra la diluizione e la concentrazione microbica pari a quella definita nello studio precedente (schema 8).

Successivamente si è proseguito con la reidratazione servendosi di acqua oligominerale preriscaldata a 60 e 70 °C.

Inoculi effettuati			Temperatura dell'acqua di idratazione (°C)	Temperatura stoccaggio del latte ricostituito	Tempi di analisi
200 ml + 1 ml di 10 ⁻⁶	200 ml + 1 ml di 10 ⁻⁵	200 ml + 1 ml di 10 ⁻⁴	60 e 70	T ambiente, 6- 10° C, 4°C	Tempo zero (T ₀) Tempo 20 ore (T ₂₀)
Schema 8 relativo ai diversi livelli d' inoculo					

Una volta omogeneizzato il prodotto si è proseguito con l'analisi quantitativa in terreno cromogenico dei diversi latti ricostituiti con differenti livelli d'inoculo.

I diversi campioni sono stati analizzati al tempo zero (t₀) e in seguito allo stoccaggio a temperature differenti dopo venti ore (t₂₀).

Le temperature utilizzate per lo stoccaggio sono state nello specifico: T ambiente, 6-10°C, temperatura a cui risulta essere normalmente il frigo domestico, e 4°C, temperatura a cui dovrebbe essere il frigorifero. Le differenti temperature di stoccaggio sono state monitorate mediante l'utilizzo di un *data logger*.

La prova è stata eseguita per due volte nelle medesime condizioni.

14 - RISULTATI

14. 1- STUDIO DEL MICRORGANISMO SUI DIVERSI TERRENI DI COLTURA

I risultati ottenuti da tale indagine hanno messo in evidenza che la crescita sui terreni cromogenici specifici per *Enterobacter sakazakii* nel tempo variano sensibilmente, tanto che le letture a 15 e 48 ore risultano essere sovrapponibili tra di loro e corrispondono a quanto definito dalla scheda tecnica. Questo è stato rilevato per *COMPASS Enterobacter sakazakii agar* e ESIA.

Per quanto riguarda *DFI formulation* è stata rilevata la crescita con una maggior colorazione alla temperatura di 37 °C (foto 1) così come descritto dalla scheda tecnica.

L'efficienza nel mettere in rilievo *E. sakazakii* in *COMPASS* e ESIA (foto 2) è stata confermata anche in sede di semina con diversi microrganismi dove con maggiore o minore difficoltà è sempre stato individuato, quando presente, in quanto facilmente distinguibile dalle altre colonie che risultano di una colorazione lilla.

Maggiori problemi si sono presentati nel caso del terreno DFI dove non si riesce o, in alcuni casi, con molta difficoltà, a individuare le colonie tipiche di *E. sakazakii*. In questo terreno risultano molto evidenti delle colonie caratterizzate da una colorazione nera riconducibile al ferro ammonio citrato.

La crescita in VRBGA ha evidenziato una crescita che a 37 °C si mantiene tipica fino al 20-24 ore, mentre a 44 °C la tipicità è mantenuta fino alle 36 ore (foto 3).

Sottolineiamo che *E. sakazakii* in tale terreno cresce dando colonie con o senza precipitato, questo ultimo è maggiormente evidente in seguito a incubazione a 44 °C.

Per quanto riguarda la crescita con i diversi microrganismi non risulta essere particolarmente utile al fine dell'individuazione del microrganismo in esame perchè le colonie non risultano avere differenze.

Lo studio in TSA rende visibile la colorazione gialla delle colonie alle diverse temperature fino alle 36 ore dopodichè alla temperatura di 44 °C il colore giallo comincia a spegnersi ed essere meno brillante, mentre a 25° C comincia a essere ancora più carico ed evidente rispetto ai tempi di lettura precedenti (foto 4).

In presenza delle altre Enterobatteriacee le letture a 48 e 72 ore risultano essere fondamentali per identificare le colonie di *Enterobacter sakazakii* che si differenziano con facilità dalle altre colonie.

E. sakazakii in McConkey (foto 5) coltiva con colonie di colore rosso con un alone di precipitazione ben evidente e rimangono del colore caratteristico fino alla lettura a 36 ore dopo di che perdono la tipicità.

Tale terreno non è molto utile al fine di effettuare una distinzione tra *E. sakazakii* e gli altri microrganismi inoculati.

In HEA, *Enterobacter* spp., dopo un' incubazione di 24 ore a 37°C, coltivano con colonie rosso salmone così come *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. (foto 6) saccarosio/salicina fermentanti e rimane tipica fino 36 ore. Per tanto può essere interessante utilizzare tale terreno per distinguere il microrganismo in esame da alcuni altri microrganismi, ma non dà una risposta netta in termini di individuazione diretta di *E. sakazakii*.

Su XLT4 *E. sakazakii* coltiva con colonie gialle e il terreno vira dal rosso al giallo facilmente distinguibile da *Salmonella*.

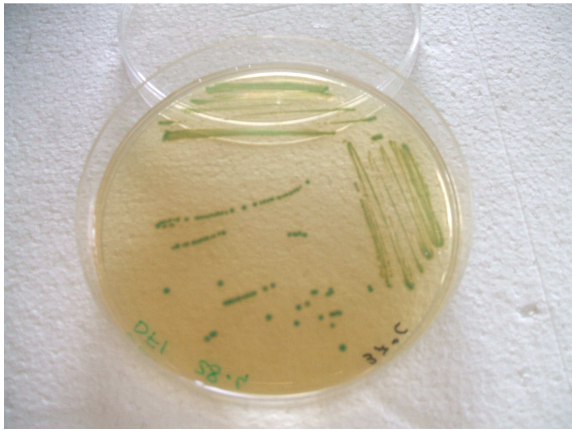


Foto 4: Crescita in DFI

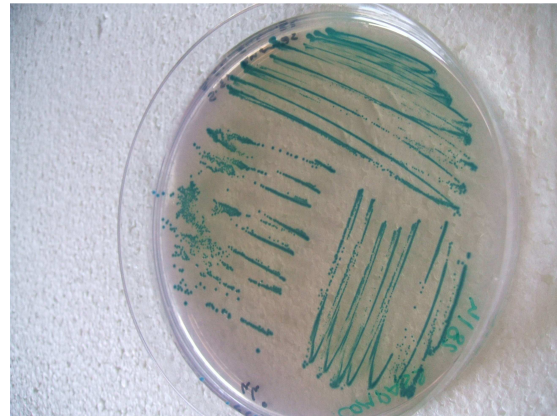


Foto 5: Crescita in COMPASS



Foto 6: Crescita in VRBGA

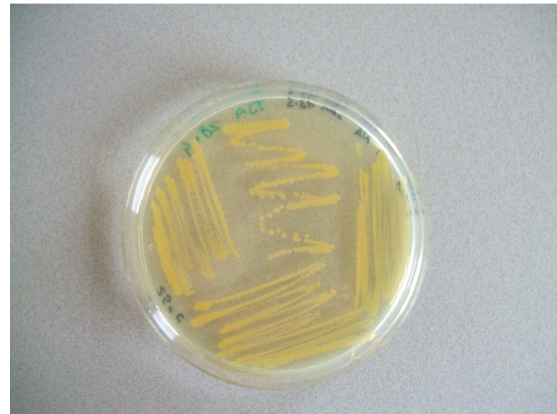


Foto 7: Crescita in *Tryptone Soy Agar*

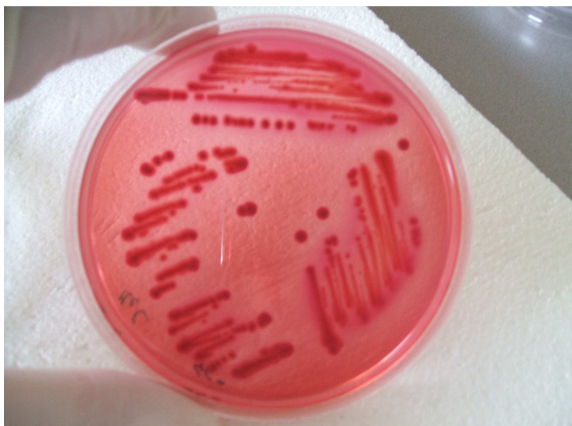


Foto 8: Crescita in MacConkey Agar

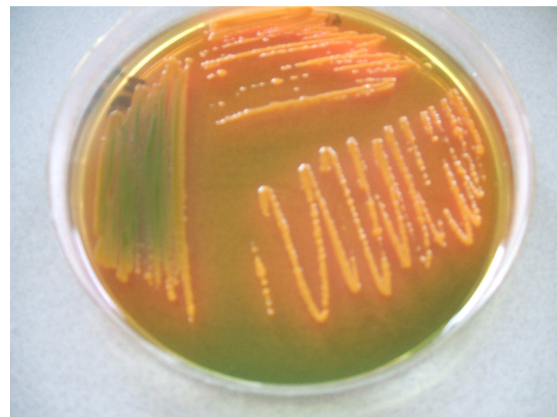


Foto 9: Crescita in *Hektoen Enteric Agar*

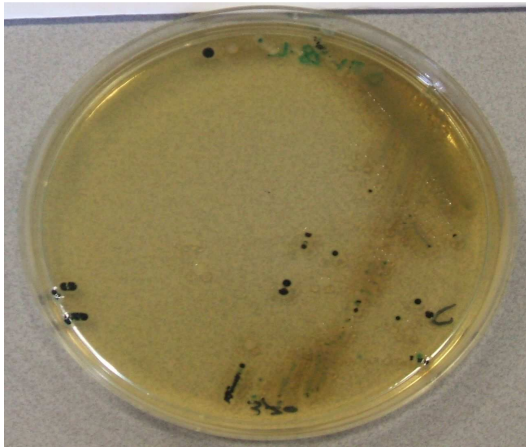


Foto 10: Crescita in DFI

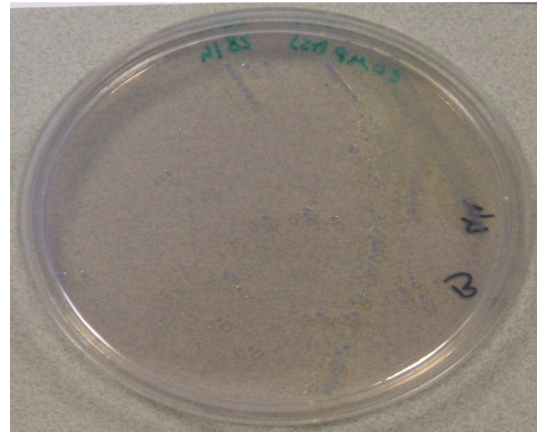


Foto 11: Crescita in COMPASS

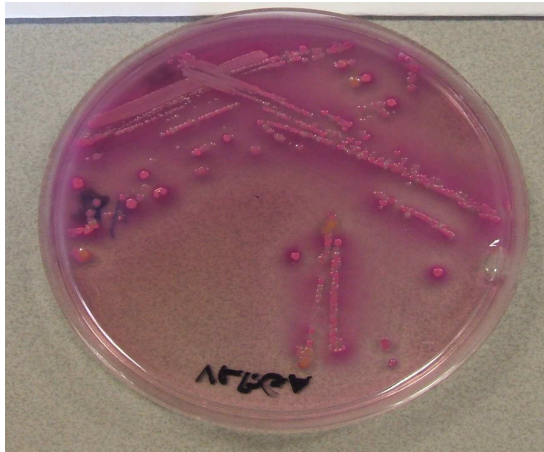


Foto 12: Crescita in VRBGA

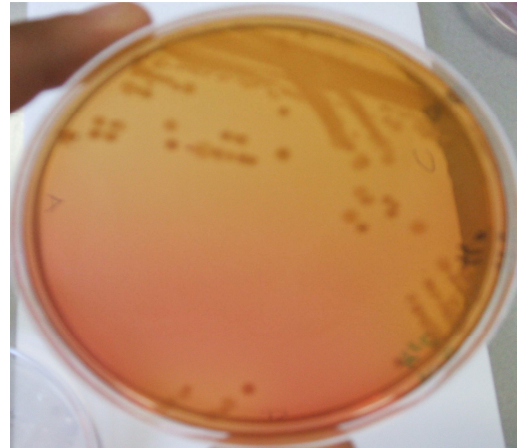


Foto 13: Crescita in XLT₄

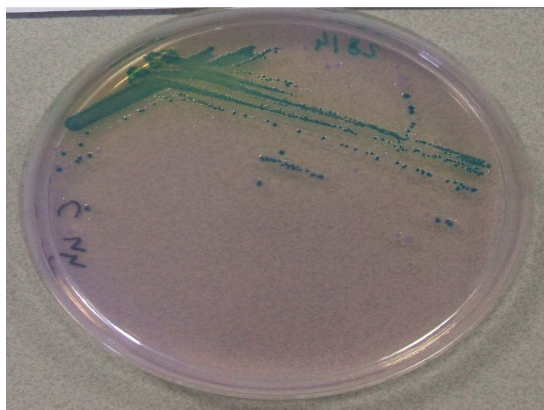


Foto 14: Crescita in ESIA



Foto 15: Crescita in *Hektoen Enteric Agar*

14.2 - ANALISI DEI PRODOTTI PER L'INFANZIA

Buona parte dei campioni hanno mostrato la presenza di una carica microbica totale (CMT) piuttosto variabile.

Per quanto riguarda il latte in polvere sono stati trovati dei valori che oscillano da 1,7 a 5,3 log ufc/g. I valori più elevati tendono a coincidere con i latti di proseguimento, i quali sono assunti dal neonato a partire dal sesto mese, età alla quale il neonato presenta generalmente una maggior capacità di difesa. In alcuni casi si è visto che cariche microbiche elevate tendono a essere presenti in latti acquistati in ipermercati e in un caso il campione proveniva da una farmacia.

Una considerazione in più va fatta per i latti in polvere acquistati in negozi specializzati per la vendita di prodotti asiatici, in quanto, pur non arrivando direttamente da questi paesi, presentano cariche elevate giustificate da un'elevata presenza di lieviti. Alcuni di questi latti in polvere tra le indicazioni e i metodi d'uso presentano un'importante nota: *"non somministrare a bambini con età inferiore ai 12 mesi"*.

Per le pappe analizzate, i valori di CMT variano tra 1,3 e 4,5 log ufc/g. I campioni che hanno le cariche più elevate, sono per lo più costituite da muffe e lieviti, mentre in altri casi sono presenti batteri lattici, quando è aggiunto latte in polvere.

Gli enterobatteri erano presenti in un solo campione di latte in polvere pari a 3,0 log ufc/g e, più precisamente, esso era un latte di proseguimento acquistato in farmacia. I coliformi totali sono risultati assenti in tutte le tipologie di campioni analizzati, a esclusione di un omogeneizzato acquistato in un supermercato.

I campioni che hanno presentato un certo livello di carica sono riportati nelle tabelle da 20 a 23 suddivisi secondo il luogo di acquisto del prodotto analizzato.

Per meglio comprendere i dati riportati nelle tabelle, si precisa che 1,7 corrisponde a cariche inferiori a 100 ufc/g.

n. campione	Matrice	CMT log/g	Enterobatteri log/g	Muffe	Lieviti
959*	Latte in polvere	4,3	1,7	2,3	1,7
1158		3,3	1,7	1,7	1,7
962	Pappa	3,0	1,7	1,7	2,3
1151	Omogeneizzati	3,5	2,5	1,7	2,5

Tabella 20: Risultati dei diversi campioni analizzati proveniente da supermercati

n. campione	Matrice	CMT log/g	Enterobatteri log/g	Muffe	Lieviti
987	Latte in polvere	4,9	1,7	1,7	1,7
1056*		3,0	1,7	3,0	2,3
1149		2,2	1,7	1,7	1,7
1150		3,5	1,7	1,7	1,7
1234		2,5	1,7	1,7	2,3
1237*		2,0	1,7	1,7	1,7
961		4,5	1,7	1,7	2,5
986	Pappa	3,4	1,7	2,7	4,0
1021		1,7	1,7	2,0	1,7
1022		1,7	1,7	1,7	2,0
1135		4,0	1,7	1,7	1,7
1136		4,3	1,7	1,7	1,7
1137		4,3	1,7	1,7	1,7

Tabella 21: Risultati di alcuni dei campioni analizzati proveniente da ipermercati

n. campione	Matrice	CMT log/g	Enterobatteri log/g	Muffe	Lieviti
1059*	Latte in polvere	5,3	3,0	1,7	3,5

Tabella 22: Risultati di alcuni dei campioni analizzati proveniente da farmacia

n. campione	Matrice	CMT log/g	Enterobatteri log/g	Muffe	Lieviti
1225	Latte in polvere	4,4	1,7	1,7	4,2
1226	condensato	3,3	1,7	1,7	1,7
1233		2,5	1,7	1,7	2,3

Tabella 23: Risultati dei diversi campioni analizzati proveniente da negozi specializzati nella vendita di prodotti asiatici.

* si tratta di latte in polvere di proseguimento

Alcune della pappe, confezionate in contenitori d'alluminio, al momento dell'analisi presentavano del bombaggio fisico.

In termini dei parametri chimico-fisici ricercati, i risultati ottenuti sono i seguenti:

- a) valori di a_w molto bassi per i prodotti in polvere che oscillano da 0,153 a 0,299; per le pappe la situazione non si scosta di molto essendoci valori compresi tra 0,150 e 0,390 (tabella 24); mentre per gli omogeneizzati, i latti concentrati e condensati i valori di a_w sono molto elevati e si aggirano intorno a valori di 0.839 e 0.986;
- b) per il pH i valori sono molto vicino alla neutralità e variano tra un minimo di 6,49 e 7,51 la stessa situazione si rispecchia anche per le pappe (tabella 25).

Valori a_w	campioni LATTE	campioni PAPPA
< 0.200	6	3
0.200 – 0.300	6	4
> 0.300	5	7

Tabella 24: Classificazione valori a_w latte in polvere e pappe

Valori a_w	campioni OMOGENEIZZATI	campioni CONC/EVAPO
< 0,900	0	1
0,900 – 0,920	0	2
0,920 – 0,970	1	1
> 0,970	5	0

Tabella 25: classificazioni valori a_w omogeneizzati e concentrati

In ragione di ciò possiamo, quindi, affermare che le cariche microbiche ritrovate e rappresentate per lo più da flore fungine, sono giustificate dai bassi valori di A_w che interessano i prodotti analizzati. Esse presentano una maggior resistenza nei confronti di tale parametro.

L'unico caso di enterobatteri, tra l'altro, si registra in omogeneizzato il quale presenta valori decisamente elevati di A_w .

In termini di pH i valori si aggirano attorno alla neutralità e quindi tale parametro ha un' influenza insignificante a livello di controllo microbiologico.

L' effetto dell' A_w di *E. sakazakii* è stato studiato da Brewer e coll. (2003); essi hanno condotto uno studio confrontando in termini di resistenza allo stress osmotico *E. sakazakii* e altri microrganismi paragonando la sopravvivenza in BHI + sorbitolo in concentrazione pari al 40 e al 75% che corrispondono rispettivamente ad A_w di 0,934 e di 0,811 in funzione del tempo (grafico 3 e 4).

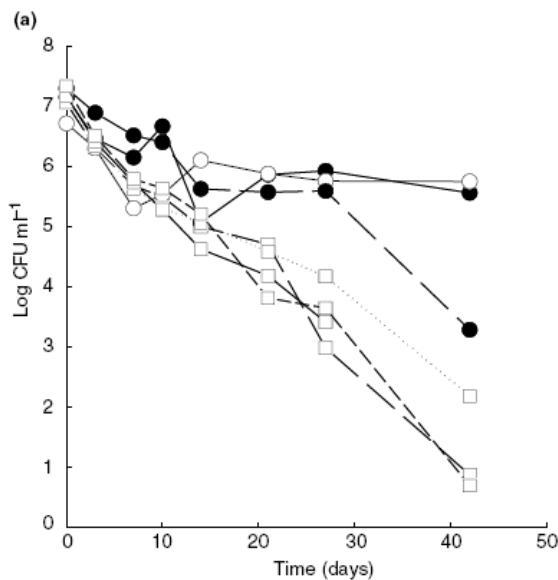


Grafico 3: BHI + 40% sorbitolo

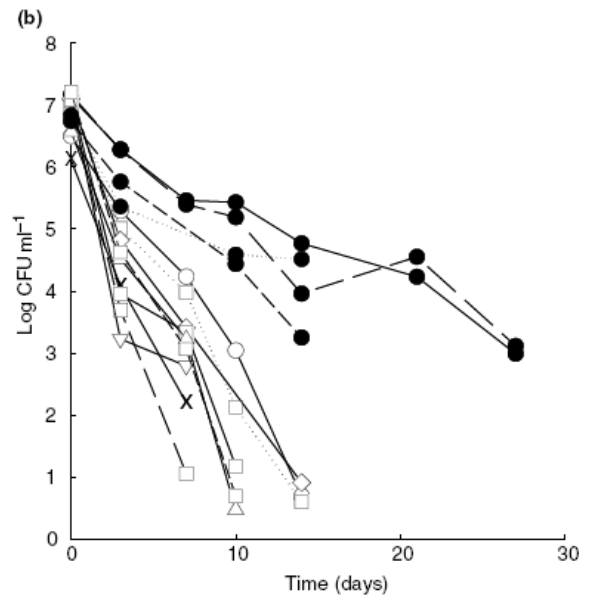


Grafico 4: BHI + 75% sorbitolo

I simboli rappresentano ceppi di:

- *E. sakazakii* 1387-2;
- *E. sakazakii* 1360;
- *E. sakazakii* 16;
- *E. sakazakii* 145;
- *E. agglomerans* 175;
- *Salmonella senftenberg* 473;
- *Salmonella typhimurium* 447;

- *Salmonella enteriditis* 331;
- *Salmonella enteriditis* 495;
- ▽— *Escherichia coli* 219;
- ◇— *Klebsiella pneumonia* 99;
- x— *Serratia rubidea* 105;
- △— *Citrobacter freundii* 92

È stato, inoltre, confrontato il comportamento di *E. sakazakii* in fase esponenziale e stazionaria alla temperatura di 25 °C in BHI + 75% di sorbitolo (grafico 5).

Questo mette ulteriormente in evidenza la difficoltà che può presentare un alimento con A_w bassa in termini di sviluppo microbico in quanto in presenza di alte concentrazioni di zuccheri la carica diminuisce velocemente nella soluzione e questo si rispecchia comprensibilmente nei prodotti alimentari. La fase di crescita gioca un ruolo importante in termini di sopravvivenza infatti *E. sakazakii* ha una sopravvivenza maggiore in fase stazionaria rispetto alla fase esponenziale.

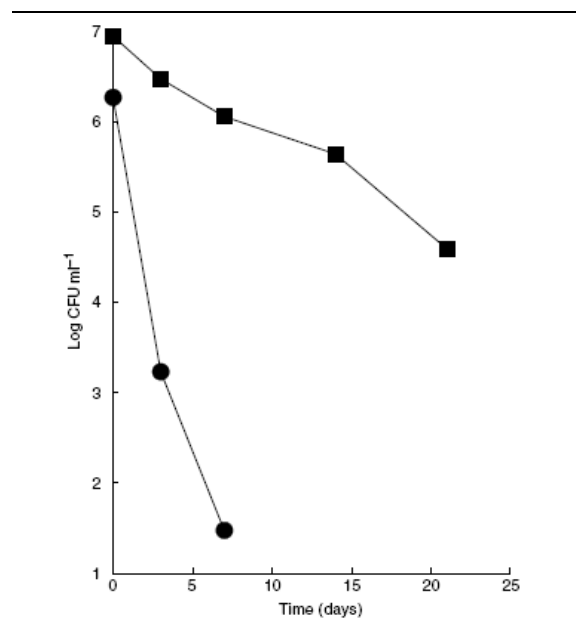


Grafico 5: Sopravvivenza a 25 °C in fase stazionaria (▪) ed esponenziale (●)

14.3 - SENSIBILITÀ DELLE PROCEDURE DI RICERCA PER L'ISOLAMENTO DEL MICRORGANISMO

Per quanto riguarda la semina in terreno cromogenico agarizzato prima del passaggio in brodo d'arricchimento si è notata una linearità che rispecchia i livelli d'inoculo proporzionale al volume preso in considerazione.

L'impiego del rispettivo brodo d'arricchimento prima della semina su terreni cromogenici ha evidenziato un'importanza fondamentale nell'incrementare in modo considerevole la presenza di *E. sakazakii* nel campione così che in questo caso ha permesso di mettere ben in evidenza il microrganismo sopra certi livelli d'inoculo.

I risultati discussi sono relativi all'impiego di latte crudo il quale è stato inoculato con *E. sakazakii* allo scopo di mettere in rilievo la sensibilità dei metodi impiegati per l'identificazione del microrganismo in analisi.

L'utilizzo del latte crudo ha messo in evidenza una particolarità rappresentata dalla presenza nel campione di *H. alvei* la quale è in grado di dare delle colonie su terreno cromogenico con morfologia simile a *E. sakazakii* qualora la lettura fosse fatta prima delle 24 ore. A questo riguardo è risultata fondamentale l'indagine effettuata sui diversi terreni (paragrafo 14.1) che mettono in evidenza ancora una volta l'importanza di rispettare i tempi definiti dalle schede tecniche di ciascun terreno impiegato (dopo le 24 fino alle 48 ore per COMPASS ed ESIA).

Possiamo, quindi, affermare che il metodo d'indagine che prevede l'utilizzo di ESSB-ESIA e mLSTV/COMPASS *E. sakazakii* Agar sono sovrapponibili e i brodi d'arricchimento hanno dimostrato di avere una grande importanza nel caso in cui i livelli d'inoculo fossero stati al di sopra di 1,5 ufc/ml. Invece, per quanto riguarda l'inoculo inferiore a 1 ufc/ml, il microrganismo non è stato messo in evidenza né dal passaggio diretto né tanto meno dopo il passaggio in brodo d'arricchimento. In questo caso pur essendo

presente nella semina di controllo dell'inoculo, non sono state individuate colonie tipiche (colore indaco) del microrganismo sui terreni cromogenici; tuttavia, le colonie di colore lilla non escludono che *E. sakazakii* non sia presente poiché in alcuni casi sporadici coltiva con questa morfologia.

I risultati di questa indagine ci consentono di supporre che i metodi d'indagine hanno una buona sensibilità essendo in grado di individuare livelli d'inoculo pari a 1,5 ufc/ml. Il fatto di non mettere in evidenza livelli d'inoculo < 1 ufc/ml può essere dovuta sì a un metodo d'indagine che non si spinge oltre certi limiti ma può anche significare che la flora microbica naturalmente presente nel latte riesce a inibire o comunque controllare l'eccessivo sviluppo di *E. sakazakii* sotto certi livelli.

14.4 - INFLUENZA DELLE TEMPERATURE DI RICOSTITUZIONE DEL LATTE IN POLVERE SU *E. sakazakii* – PROVA PRELIMINARE

I risultati delle due prove (tabella 26 a-b) mostrano lo stesso andamento in termini di temperatura dell'acqua di reidratazione.

Più precisamente, possiamo definire che le analisi effettuate a tempo t_0 , immediatamente dopo l'inoculo, dimostrano l'assenza di microrganismi nel latte reidratato e ciò si rispecchia per entrambe le temperature di idratazione (60 e 70 °C), ma anche per i diversi livelli d'inoculo (A, B, C). Tale risultato potrebbe essere dovuto al calore dell'acqua di idratazione e ai bassi livelli di carica microbica presenti nel latte in polvere che portano a un momentaneo stress termico il microrganismo.

Le analisi effettuate a distanza di 20 ore rispetto all'inoculo (t_{20}) mettono in evidenza l'importanza delle diverse temperature di stoccaggio del prodotto. Infatti si ottengono i seguenti risultati:

- la reidratazione a 60 °C vede la presenza di *E. sakazakii* sia nello stoccaggio a 6 – 10 °C che a temperatura ambiente quest'ultima mostra una popolazione molto più consistente legata a temperature che favoriscono maggiormente lo sviluppo;
- quella a 70 °C è diversa in quanto solamente nel caso dello stoccaggio a T ambiente si registra presenza di *E. sakazakii*;
- una differenza di 3 gradi logaritmici tra le due temperature di idratazione al tempo t_{20} e stoccaggio a temperatura ambiente.

In definitiva, possiamo, quindi, sostenere che la temperatura di reidratazione a 60 e 70 °C ha una grande importanza a livello microbiologico: in entrambe le temperature il microrganismo subisce uno stress termico che si manifesta in modo molto più evidente per la temperatura più alta.

Risultati prima prova	A			B	C
Inoculo (ufc/200 ml)	70			430	2440
ufc/ml	0.4			2.1	12.2
	A	B	C	T di reidratazione	T di stoccaggio
ufc/ml T ₀	0	0	0	60°C	4 °C
ufc/ml T ₂₀	0	0	0		
ufc/ml T ₀	0	0	0	70°C	
ufc/ml T ₂₀	0	0	0		
ufc/ml T ₀	0	0	0	60°C	6 - 10 °C
ufc/ml T ₂₀	0	0	1,9x10 ⁴		
ufc/ml T ₀	0	0	0	70°C	
ufc/ml T ₂₀	0	2.2x10 ³	>3x10 ³		
ufc/ml T ₀	0	0	0	60°C	T ambiente
ufc/ml T ₂₀	1x10 ⁶	2.9x10 ⁷	2.1x10 ⁸		
ufc/ml T ₀	0	0	0	70°C	
ufc/ml T ₂₀	>3x10 ³	>3x10 ⁴	>3x10 ⁵		

Tabella 26 a: Risultati temperature reidratazione con stoccaggio a temperature differenti

Risultati seconda prova	A			B	C
Inoculo (ufc/200 ml)	30			435	3550
ufc/ml	0.2			2.2	17.8
	A	B	C	T di reidratazione	T di stoccaggio
ufc/ml T ₀	0	0	0	60°C	4 °C
ufc/ml T ₂₀	0	0	0		
ufc/ml T ₀	0	0	0	70°C	
ufc/ml T ₂₀	0	0	0		
ufc/ml T ₀	0	0	0	60°C	6 - 10 °C
ufc/ml T ₂₀	0	10	100		
ufc/ml T ₀	0	0	0	70°C	
ufc/ml T ₂₀	0	0	0		
ufc/ml T ₀	0	0	0	60°C	T ambiente
ufc/ml T ₂₀	> 3x10 ⁵	> 3x10 ⁶	> 3x10 ⁷		
ufc/ml T ₀	0	0	0	70°C	
ufc/ml T ₂₀	0	>3x10 ³	>3x10 ⁴		

Tabella 26 b: Risultati temperature reidratazione con stoccaggio a temperature differenti

15 - CONCLUSIONI

Vari microrganismi patogeni possono essere veicolati dal latte formulato in polvere destinato all'alimentazione del neonato; in base all'associazione causale tra la presenza nel latte in polvere e la malattia del neonato, i microrganismi patogeni possono essere suddivisi in tre distinte categorie (Joint FAO/WHO, 2004):

- *Categoria A*

Appartengono a questa categoria *Salmonella enterica* ed *E. sakazakii*, microrganismi che causano severe patologie (infezioni sistemiche, enterocoliti necrotizzanti, diarree severe) nei soggetti alimentati con latte in polvere contaminato, per i quali è stata dimostrata microbiologicamente ed epidemiologicamente una chiara associazione tra presenza nel prodotto (veicolo e fonte dell'infezione) e insorgenza della malattia.

- *Categoria B*

Appartengono a questa categoria altre specie di Enterobacteriaceae che sono capaci di causare severe patologie (infezioni sistemiche, enterocoliti necrotizzanti, diarree severe) nei neonati e che sono state isolate nel latte in polvere per l'infanzia ma per le quali non esistono chiare evidenze epidemiologiche e microbiologiche che dimostrino la correlazione tra il prodotto contaminato e l'infezione nei neonati.

- *Categoria C*

Appartengono a questa categoria microrganismi quali, *Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, che sebbene capaci di provocare gravi malattie nei neonati, non sono stati isolati dal latte in polvere per l'infanzia o, quando ciò è avvenuto, non sono stati riconosciuti come gli agenti responsabili.

E. sakazakii è oggetto di crescente preoccupazione tra le autorità sanitarie e i produttori di alimenti per l'infanzia, non bisogna dimenticare che ci sono numerosi aspetti che possono essere d'interesse per i neonatologi, le direzioni sanitarie, i responsabili dei laboratori di analisi ospedalieri, le autorità di controllo e le aziende produttrici di alimenti per l'infanzia, nell'intento di contribuire alla diffusione della sua conoscenza e facilitare l'adozione di corrette strategie per controllare il rischio di infezione nella popolazione più sensibile, i neonati.

E. sakazakii è un patogeno emergente, spesso veicolato da latte in polvere e responsabile di una serie di infezioni, a volte con esito letale, prevalentemente in una particolare fascia di popolazione.

Oltre alla suscettibilità del paziente, i fattori che contribuiscono al rischio di infezione includono il livello di contaminazione dell'alimento, la termotolleranza del microrganismo, la velocità di crescita, la dose infettante e la virulenza del microrganismo.

Partendo dal presupposto che il trattamento termico che il latte subisce effettui

un risanamento del prodotto dal punto di vista microbiologico, si può desumere

che probabilmente la contaminazione avvenga in qualche punto tra il processo di *spray-drying* e il confezionamento.

È di fondamentale importanza adottare degli accorgimenti in modo da eliminare o comunque ridurre il più possibile il rischio di contaminazione del latte in polvere e questo è possibile farlo a diversi livelli.

In termini di stabilimenti per la produzione del latte formulato ricordiamo che differiscono per diversi aspetti, come per esempio l'anno di costruzione, i materiali, la struttura e le condizioni di lavabilità; questi aspetti influenzano il grado di efficienza nel controllare la popolazione microbica. Il rischio di contaminazione microbica nei latti formulati in

polvere pare sia infatti maggiormente legato all'ambiente di produzione, più che ai singoli processi produttivi (Gurtler *et al.*, 2005).

L'applicazione delle Buone Pratiche di Lavorazione (GMP), delle Buone Pratiche Igieniche (GHP) e dell'Analisi del Rischio e Controllo dei Punti Critici (HACCP) sono misure volte a identificare e controllare le varie possibilità di contaminazione dei lattini formulati in polvere sia a livello di produzione che di lavorazione (<http://www.efsa.eu.it>). Nell'intero processo produttivo, la qualità igienica delle materie prime, dei filtri per l'aria o per l'acqua, dei setacci, dei rilevatori di metalli e dei magneti, le temperature di pastorizzazione e di stoccaggio si pongono come importanti punti di controllo (<http://www.efsa.eu.it>; FAO/WHO, 2004).

In termini di ricostituzione, alcuni produttori di latte formulato in polvere raccomandano che il latte venga ricostituito, immediatamente prima di ogni poppata, utilizzando acqua bollente. Infatti, le prove condotte hanno mostrato che l'utilizzo di acqua a temperatura pari o maggiore ai 70° C è in grado di assicurare una riduzione della carica batterica di *E. sakazakii* di circa tre gradi logaritmici, lo stesso Edelson e coll. in seguito a prove condotte nel 2004 sostenevano che tale temperatura sarebbe addirittura in grado di portare a una riduzione di *E. sakazakii* di 4 gradi logaritmici. Va sottolineato che raramente si rispetta tale temperatura; in primo luogo perché le stesse case produttrici indicano valori inferiori in sede di preparazione e in secondo luogo perché temperature così alte potrebbero avere conseguenze per quanto riguarda l'aspetto nutritivo (distruzione di elementi termolabili, come le vitamine) e può creare problemi nella manipolazione e somministrazione del prodotto. Per tali ragioni non sempre questa condizione viene rispettata e, di conseguenza, la temperatura prescelta spesso non è in grado di inattivare *E. sakazakii*, anche perché, temperature inferiori hanno mostrato di esercitare solamente un'azione di momentanea disattivazione che può riprendere senza problemi in poche ore.

Un importante accorgimento va riservato anche alla conservazione del prodotto ricostituito: a tale proposito, le ditte produttrici invitano, non a

caso, a eliminare il prodotto rimanente dopo la poppata, ma non è da escludere che a livello domestico e/o ospedaliero vengano preparati più biberon pronti all'uso da riscaldare al momento della somministrazione. Considerando la buona resistenza termica di *E. sakazakii*, questa abitudine è da ritenere altamente a rischio (Edelson *et al.*, 2004) anche perchè nonostante sia stata dimostrata la cessazione della crescita di *E. sakazakii* a temperature di refrigerazione (4°C) (Nazarowec *et al.*, 1997b), non sempre la temperatura dei frigoriferi domestici corrisponde a questo valore, principalmente per le ripetute operazioni di apertura e chiusura dell'elettrodomestico che possono susseguirsi nell'arco di una giornata.

Le prove preliminari di contaminazione sperimentale del latte dimostrano che il mantenimento del prodotto latteo a temperature superiori a 4 °C permettono al patogeno, una volta riadattatosi al substrato per il trattamento termico subito nella ricostituzione (60 e 70 °C), di moltiplicare in un lasso di tempo variabile a seconda della temperatura stessa di conservazione: a 6/8 °C dopo 20 ore raggiunge valori superiori a 10³ e a 18/22°C per lo stesso tempo si ottengono valori superiori a 10⁵ ufc/ml. Mentre il mantenimento in frigorifero (temperatura inferiore a 4 °C) in tutti i casi, anche nell'inoculo maggiore (circa 15 ufc/ml), non è mai stato riscontrato il microrganismo a dimostrazione che il trattamento termico (60 e 70 °C) ha ridotto il numero e stressato le cellule sopravvissute e la bassa temperatura di conservazione non ne ha permesso la loro rivitalizzazione.

Un importante aspetto da considerare nel momento dell'acquisto del prodotto in polvere, potrebbe essere la tipologia di presentazione del prodotto al consumatore: sarebbero da preferire quei prodotti le cui confezioni presentano sacchetti multipli all'interno contenenti una quantità non eccessiva di prodotto da ricostituire in modo tale da consumare più rapidamente il loro contenuto evitando così eventuali contaminazioni microbiche e/o alterazioni delle caratteristiche chimico-fisiche (irrancidimento dei grassi, umidificazione della polvere, ecc.) che

potrebbero compromettere da una parte la qualità organolettica del prodotto e dall'altra quella addirittura igienico-sanitaria, ben peggiore. Non da meno risulta essere l'importanza del cucchiaino in dotazione con il prodotto il quale può essere utilizzato in modo inopportuno andando così ad aumentare notevolmente il rischio di contaminazione microbica.

I prodotti analizzati pur avendo dimostrato per circa una metà la presenza di carica microbica, solamente 2 hanno mostrato una certa presenza di enterobatteri e va sottolineato soprattutto che in un caso si trattava di omogeneizzato e nell'altro di latte in polvere di proseguimento.

In linea generale, possiamo quindi dire che lo studio condotto ha mostrato che i prodotti in polvere per lattanti presentano una buona qualità microbiologica dovuta soprattutto al processo a cui sono stati sottoposti per aumentare la *shelf life* grazie a valori di A_w molto bassi.

Nonostante ciò, non va dato nulla per scontato, perché non bisogna dimenticare che i prodotti dell'infanzia in polvere non sono assolutamente sterili e che le fonti di questo microrganismo non sono ancora note anche se la presenza di infestanti e contaminanti (*Blatta orientalis* e tignola del grano in primo luogo) portano in se aspetti molto interessanti essendo ubiquitari, interessando così allo stesso modo l'industria, l'azienda ospedaliera nonché l'ambiente domestico.

In termini di ambiente domestico importanti risultano le stesse contaminazioni crociate, infatti pur non avendo trovato problemi di enterobatteri a livello di latte in polvere per lattanti quest'ultimi, in alcuni casi, sono stati ritrovati in latte di proseguimento, omogeneizzati e pappe. Questo può aumentare il rischio nel neonato di contrarre il microrganismo se in tale nucleo familiare ci sono altri bambini che utilizzano tali prodotti.

A questo punto possiamo concludere definendo che è necessario che tutte le parti interessate si impegnino per ridurre i rischi derivanti da *E. sakazakii* e questo è possibile tramite varie azioni combinate (ADA, 2003; Joint FAO/WHO, 2004):

a) a livello produttivo risulta necessario:

- monitorare le materie prime, in particolare gli ingredienti che non necessitano di un ulteriore trattamento termico prima della miscelazione;
- ridurre i livelli delle Enterobacteriaceae nell'ambiente di produzione;
- incrementare la frequenza dei controlli negli ambienti di produzione e sul prodotto finito al fine di verificarne la conformità alla normativa nazionale e in caso di positività identificare le sorgenti di contaminazione mettendo in atto le più appropriate azioni correttive;
- revisionare le istruzioni per la preparazione del latte suggerendo una temperatura dell'acqua di solubilizzazione più alta ($> 70\text{ °C}$);

b) a livello domestico risulta necessario:

- adottare stringenti norme igieniche utilizzando contenitori puliti e disinfettati;
- in sede di preparazione attenersi scrupolosamente ai consigli indicati sulle confezioni soprattutto del latte in polvere per lattanti
- preparare solo la poppata necessaria per il pasto evitando di preparare in anticipo quelle dei pasti successivi o in caso di necessità limitare a 1-2 quelle preparate in anticipo;
- evitare di lasciare a temperatura ambiente il latte ricostituito se non utilizzato;
- assicurare il raffreddamento rapido del prodotto ricostituito e la sua conservazione in frigorifero;
- limitare il più possibile l'intervallo di tempo tra la ricostituzione del prodotto e il suo consumo;

c) a livello ospedaliero/asili nido risulta necessario:

- adottare buone pratiche di igiene nelle aree di preparazione;

- predisporre linee guida riguardo la preparazione, manipolazione, conservazione e procedure di controllo del prodotto, accessibili al personale addetto;
- disporre di una stanza adibita solamente alla preparazione, che sia separata dai reparti di degenza (negli ospedali), provvista di un'area per lo stoccaggio del prodotto e frequentata unicamente da personale autorizzato;
- se la struttura manca di un'apposita stanza per la preparazione, predisporre comunque un'area da destinarsi unicamente a tale scopo;
- disporre di utensili e attrezzature costruiti in modo tale da poter essere facilmente sanificati;
- sottoporre a trattamento termico (esempio: lavaggio in lavastoviglie) o ad autoclavaggio tutti gli utensili adoperati per la preparazione;
- utilizzare, quando possibile, utensili monouso;
- disporre di personale qualificato e specializzato (esempio: dietiste);
- assicurare il raffreddamento rapido del prodotto ricostituito e la sua conservazione in frigorifero;
- limitare il più possibile l'intervallo di tempo tra la ricostituzione del prodotto e il suo consumo;
- evitare di lasciare a temperatura ambiente il latte ricostituito se non utilizzato;
- richiudere opportunamente i contenitori dei latti non utilizzati completamente, riporli in frigorifero, apponendo sopra la data di scadenza;
- utilizzare, quando possibile, latte in forma liquida;
- applicare un corretto piano di autocontrollo che preveda la valutazione dei potenziali pericoli, l'identificazione dei punti critici di controllo (CCP), il monitoraggio dei punti critici di controllo, un piano per le non conformità e le azioni correttive necessarie, la verifica del sistema e la registrazione dei risultati.

BIBLIOGRAFIA

ARSENI A, MALAMOU-LADAS E, KOUTSIA C, XANTHOU M TRIKKA E. (1987) Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii*. *J Hosp Infect* **9**:143-50.

BAKER ROBERT D. (2002) Infant formula safety. *Pediatrics*,**110**:833-35.

BAR-OZ B, PREMINGER A, PELEG O, BLOCK C ARAD I. (2001) *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta Paediatr*;**90**:356-58

BIERING G, KARLSSON S, CLARK NC, JONSDOTTIR KE, LUDVIGSSON P STEINGRIMSSON O. (1989) Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J Clin Microbiol* **27**:2054-56.

BLOCK C, PELEG O, MINSTER N, BAR-OZ B, SIMHON A, ARAD I, SHAPIRO M. (2002) Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. *Eur J Clin Microbiol Infect* **21**:613-16.

BREEUWER P, LARDEAU A, PETERZ M JOOSTEN HM. (2003) Dessication and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J Appl Microbiol* **95**:967-73.

BRUCE J. (1996) Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food. *Food Technol*;**50**:77-81.

BURGOS J, VARELA M. (2002) Multiple antibiotic resistant dairy soil bacteria. In: *102nd General Meeting of the American Society for Microbiology*. Salt Lake City (Utah), May 19-23,. Session 25, Paper A-31.

CAC (Codex Alimentarius Commission). (2003) *Risk profile of Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula*. Roma:

Joint Office FAO/WHO (Joint FAO/WHO Food Standard Programme – Codex Committee on Food Hygiene; CX/FH 04/12). Disponibile all'indirizzo:

http://www.codexalimentarius.net/ccfh36/fh04_01e.htm.

Ultima

consultazione 8/09/2004.

CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION, (2002) United States Department of Health and Human Services, United States Food and Drug Administration. Health professional letters on *Enterobacter sakazakii* infections associated with use of powdered (dry) infant formulas in neonatal intensive care units. <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/infltr3.html>

CLEMENTINO MM, DE FILIPPIS I, NASCIMENTO CR, BRANQUINHO R, ROCHA CL, MARTINS OB. (2001) PCR analyses of tRNA intergenic spacer, 16S-23S internal transcribed spacer, and randomly amplified polymorphic DNA reveal inter and intraspecific relationships of *Enterobacter cloacae* strains. *J Clin Microbiol*; **39** (11):3865-70.

DON J. BRENNER AND J. J FARMER III, (200-) "Enterobacteriales". In Bergey's manual of Systematic Bacteriology volume two, Don J. Brenner Noel R. Krieg James T. Staley

DUFFY G, LYNCHO A, CAGNEY C, (2007) Tracking emerging zoonotic pathogens from farm to fork, *Meat Science* **78**:34-42

EDELSON-MAMMEL SG BUCHANAN RL. (2004) Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *J Food Prot* **67**:60-3.

EFSA (2007) Riview of the opinion on microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae whit regard to enterobacteriaceae as indicators, *The EFSA Journal* **444**;1-14

FARBER JM. (2004) *Enterobacter sakazakii*- new foods for thought? *Lancet*; **363**:5-6.

FARMER J.J.III, DAVIS B.R., HICKMAN-BRENNER F.W., McWHORTER A., HUNTLEY-CARTER G.P., ASBURY M.A., RIDDLE C., WATHEN-GRADY H.G., ELIAS C., FANNING G.R., STEIGERWALT A.G., O'HARA C., MORRIS G.K., SMITH P.B.,

BRENNER D.J. (1984). Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **21**: 46-76.

FDA (Food and Drug Administration) (2002) *Isolation and enumeration of Enterobacter sakazakii from dehydrated powdered infant formula*. College Park (Maryland): US Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition

FIORE A., CASALE M., AURELI P. (2004) " Pericoli microbiologici emergenti nell' alimentazione del neonato: il caso *Enterobacter sakazakii* "Rapporto Istituto Superiore di Sanità 04/13

GIRLICH D, POIREL L, LEELAPORN A, KARIM A, TRIBUDDHARAT M, NORDMAND P. (2001) Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol*; **39** (1):175-82.

HAMILTON JW, LEHANE MJ, BRAIG HR. (2003) Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Emerg Infect Dis* **9**:1355-56

ICMSF International Commission on Microbiological Specification for Foods (2002) Microbiological testing in food safety management. In:

Microorganisms in foods. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. vol. **7**, cap. 8.

IVERSEN C, FORSYTHE S. (2003) Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Sci and Technol* **14**:443-54

IVERSEN C, LANE M FORSYTHE SJ. (2004) The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett Appl Microbiol* 2004

IVERSEN C., DRUGGAN P., FORSYTHE S. (2004a). A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.*, **96**: 133-139.

IVERSEN C., LANE M., FORSYTHE S.J. (2004b). The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett. Appl. Microbiol.*, **38**: 378-382.

KANDHAI MC, REIJ MW, GORRIS LGM, GUILLAUME-GENTIL O, VAN SCHOTHORST M. (2004) Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *Lancet*; **363**:39-40.

KEMPF B. AND BREMNER E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**, 319–330.

KLEIMAN MB, ALLEN SD, NEAL P, REYNOLDS J (1981). Meningoencephalitis and compartmentalization of the cerebral ventricles caused by *Enterobacter sakazakii*. *J Clin Microbiol*; **14**:352-4.

LAI KK. (2001) *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults. Case reports and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **80**:113-22.

LEHNER A., STEPHAN R. (2004). Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *J. Food Prot.*, **67**: 2850-2857.

LEUSCHNER R.G.K., BAIRD F., DONALD B., COX L.J. (2004). A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in instant formula. *Food Microbiol.*, **21**: 527-533.

Ministero della Salute. Circolare 24 ottobre 2000, n. 16. Promozione a tutela dell'allattamento al seno. *Gazzetta Ufficiale- Serie Generale* n. 263, 10 novembre 2000.

MUYTJENS H.L., ROELOFS-WILLEMSE H., JASPAR G.H.J. (1988). Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.*, **26**: 743-746.

NAZAROWEC-WHITE M, FARBER JM. (1997a) Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried infant formula. *Lett Appl Microbiol*; **24**:9-13.

NAZAROWEC-WHITE M, FARBER JM. (1997b) Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J Food Prot*; **60**:226-30.

NAZAROWEC-WHITE, M FARBER (1999) JM. Phenotypic and genotyping typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. *J Med Microbiol*; **48**:559-67.

NAZAROWEC-WHITE M, FARBER JM, REIJ MW, CORDIER JL, VAN SCHOTHORST M. (2003) *Enterobacter sakazakii*. In: Miliotis MD, Bier JW (Ed.). *International handbook of foodborne pathogens*. U.S.A.p.407-13.

PERI C. AND ZANONI B. (1994) Essiccatori spray. Macchine e impianti, CUSL **3**:94-102

PAGOTTO FJ, NAZAROWEC-WHITE M, BIDAWID S FARBER JM. (2003) *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production *in vitro* and *in vivo*. *J Food* **66**:370-5.

Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 "Criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari" . Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 22.12.2005, L 338, 1.

Regolamento (CE) n. 1441/2007 della Commissione del 5 dicembre 2007 "Criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentare" Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 7.12.2007, L 322/12

Simmons BP, Gelfad MS, Haas M, Metts L, Ferguson J. (1989) *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect Control Hosp Epidemiol*; **10**:398-401.

THE DUPONT QUALICON. *Bax System method for the detection of Enterobacter sakazakii in selected foods*. Disponibile all'indirizzo: http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhe-dme/compendium/volume_3/e_mflp-27.html. Ultima consultazione 10/03/2004.

VAN ACKER J, DE SMET F, MUYLDERMANS G, BOUGATEF A, NAESSENS A LAUWERS S. (2001) Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with

Enterobacter sakazakii in powdered milk formula. *J Clin Microbiol*;39:293-7.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2004). *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report, Microbiological Risk Assessment Series, <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra6>.

ZOGAY X, BOKRANZ W, NIMTZ M, ROMLIND U. (2003) Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect and Immun* **71**:4151-8

APPENDICE

Schede tecniche di alcuni terreni utilizzati

Vengono di seguito riportati alcuni terreni impiegati nelle analisi per lo studio di *E. sakazakii*.

I terreni sono presentati sottoforma di allegato nel seguente ordine:

- Allegato 1:

Terreno per la ricerca di *Pseudomonas* e *Aeromonas* GSP

- Allegato 2:

Terreno per la ricerca di batteri lattici MRS

- Allegato 3:

Terreno per la ricerca di muffe e lieviti OGA

Short Product Information



GSP Agar (*Pseudomonas* / *Aeromonas*)

Art.-No. 191e

Description

Glutamate Starch Phenol Red Agar (GSP Agar) was proposed by Kielwein for detection of *Pseudomonas spp.* and *Aeromonas spp.* in food as well as wastewater. The composition of GSP Agar with glutamate and starch as nutrients is adapted to the low level of available organic carbon compounds in the natural environment of Pseudomonades and Aeromonades.

The degradation of starch by *Aeromonas spp.* will acidify the medium followed by a colour change of the pH-indicator phenol red to yellow. Pseudomonades do not acidify the medium during growth.

Most of the accompanying bacterial flora is not able to grow with glutamate and starch as nutrients and is furthermore inhibited by Penicillin.

Typical composition per litre

Sodium Glutamate	10 g
Starch	20 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0.5 g
Phenol Red	0.36 g
Penicillin	64 mg
Agar	14 g

Final pH 7.2 ± 0.2

The Agar is clear and red coloured.

Quality Control

Test strain	Culture conditions	Recovery / Colony characteristics
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	72 ± 2 h 22.5 ± 2.5°C	good growth, slightly red-violet colonies
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	72 ± 2 h 22.5 ± 2.5°C	good growth, red-violet colonies
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	72 ± 2 h 22.5 ± 2.5°C	good growth, yellow colonies
<i>Citrobacter freundii</i> * ATCC 8090	72 ± 2 h 22.5 ± 2.5°C	growth, very small colourless colonies
<i>Staphylococcus aureus</i> * ATCC 25923	72 ± 2 h 22.5 ± 2.5°C	growth inhibited

Inoculum: approximately 100 CFU; * > 10⁶ cfu

M.R.S. AGAR

INDICAZIONI

Terreno utilizzato per la crescita e il conteggio delle colture di *Lactobacillus* nei prodotti lattiero-caseari e in altri prodotti alimentari. Il terreno può essere anche utilizzato per coltivare lattobacilli a crescita lenta come *Lactobacillus br* *Lactobacillus fermentum*. Abbassando il pH, può essere utilizzato per il conteggio di *Lactobacillus bulgaricus* nello yogurt.

STORIA

Nel 1960, De Man, Rogosa e Sharpe svilupparono un terreno specifico per la coltura dei lattobacilli nei prodotti lattiero-caseari, che non richiedeva l'aggiunta di succo di pomodoro (un ingrediente di composizione molto variabile).

PRINCIPI

- I diversi peptoni, il glucosio e i sali di manganese e magnesio forniscono gli elementi nutritivi necessari per la crescita dei lattobacilli.
- Il Tween 80 è composto da una miscela di esteri oleici ed è una fonte di acidi grassi essenziali per la crescita dei batteri.
- Il fosfato dipotassico rende stabile il pH durante la crescita batterica.
- Il citrato d'ammonio e l'acetato di sodio inibiscono lo sviluppo della maggior parte dei contaminanti, inclusi streptococchi e muffe.

PREPARAZIONE

- Sciogliere 70,3 g di terreno disidratato (BK089HA) in 1 litro di acqua distillata o deionizzata.
- Portare lentamente a ebollizione, agitando fino a completa soluzione.
- Correggere il pH, in base al prodotto in esame, con acido acetico.
- Distribuire in provette o flaconi.
- Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

ISTRUZIONI PER L'USO

- Raffreddare e mantenere il terreno a 47°C.
- Trasferire in piastre Petri sterili 1 ml del prodotto da sottoporre ad analisi, e le sue diluizioni seriali decimali.
- Versare 15 ml di terreno.
- Omogeneizzare con movimenti circolari.
- Lasciare solidificare su una superficie fredda.
- Collocare le piastre inoculate in una giara per anaerobiosi in atmosfera arricchita del 5% di CO₂.
- Incubare a 37°C per 2-3 giorni.

RISULTATI

Dopo 3 giorni di incubazione, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* forma colonie lenticolari, spesso polilobate, con un diametro di 1-3 mm.

Verificare al microscopio che le cellule appartengano a bacilli non sporulati Gram-positivi.

COMPOSIZIONE TIPICA (rettificabile per ottenere un rendimento ottimale)

Per 1 litro di terreno:

- | | |
|----------------------------|---------|
| - Polipeptone | 10,00 g |
| - Estratto di carne..... | 10,00 g |
| - Estratto di lievito..... | 5,00 g |
| - Glucosio..... | 20,00 g |
| - Tween 80 | 1,08 g |
| - Dipotassio fosfato | 2,00 g |
| - Sodio acetato | 5,00 g |

- Ammonio citrato..... 2,00 g
- Magnesio solfato..... 0,20 g
- Manganese solfato..... 0,05 g
- Agar batteriologico..... 15,00 g

500 g di polvere consentono la preparazione di 7,1 litri di terreno.

CONTROLLO DI QUALITÀ

- Terreno disidratato: polvere color crema, leggermente aggregata e friabile.
- Terreno preparato: agar di colore ambra.
- Tipica risposta della coltura dopo 48 ore di incubazione a 30°C in atmosfera arricchita del 5% di CO₂ (CEN ISO/TS 11133-2:2003):

MICROORGANISMI		CRESCITA (RAPPORTO DI RENDIMENTO : P _R)
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	ATCC® 7469	P _R ≥ 70%
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC® 8014	P _R ≥ 70%
<i>Lactobacillus sake</i>	ATCC® 15521	P _R ≥ 70%
<i>Lactobacillus lactis</i>	ATCC® 19435	P _R ≥ 70%
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922	inibita, punteggio 0
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC® 11778	inibita, punteggio 0

CONSERVAZIONE/STABILITÀ

Terreno di base disidratato : 2-20°C.

- La data di scadenza è indicata sull'etichetta.

Terreno preparato (valore indicativo):

- Terreno in flaconi: 6 mesi a 2-8°C.

BIBLIOGRAFIA

- De Man, J.C., Rogosa, M., and Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. App. Bacteriol., 23, (1): 130.
- Journal Officiel (French) du 4 janvier 1978. Méthode officielle d'analyse pour le dénombrement de la flore spécifique du yaourt ou yoghourt (arrêté du 25 Novembre 1977).
- NF V 04-503: September 1988. Meat and meat products. Enumeration of lactic bacteria.
- ISO 13721. December 1995. Meat and meat products. Enumeration of lactic acid bacteria. Colony-count technique at 30°C.
- FIL-IDF 117 B: 1997. Yogurt. Enumeration of characteristic microorganisms. Colony count technique at 37°C.
- NF ISO 15214. Sept. 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count technique at 30°C.
- FIL-IDF 149A : 1997 . Levains lactiques de cultures de bactéries lactiques. Norme de composition.
- NF ISO 15214. Sept. 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count technique at 30°C.
- ISO 7889 : 2003 - IDF 117 : 2003. Yogurt. Enumeration of characteristic microorganisms. Colony count technique at 37°C.
- ISO 9232 : 2003 - IDF 146 : 2003. Yogurt - Isolation of characteristics microorganisms (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*).

OXYTETRACYCLINE GLUCOSE AGAR (O.G.A.) BASE**INDICAZIONI**

Terreno utilizzato per la ricerca e il conteggio di lieviti e muffe nei prodotti alimentari e nei cosmetici.

STORIA

Nel 1965, Buttiaux e Catsaras raccomandarono l'uso di questo terreno per la ricerca di lieviti e muffe nella birra. Successivamente, Sainclivier e Roblot lo consigliarono per l'analisi del burro. Mossel dimostrò inoltre che un pH neutro consentiva un recupero migliore rispetto a un pH acido con diversi tipi di alimenti (il pH è l'unico meccanismo selettivo che ostacola la crescita dei batteri in questo particolare terreno).

PRINCIPI

- La crescita di lieviti e muffe è favorita dalla presenza del glucosio e dell'estratto di lievito.
- L'aggiunta di oxitetraciclina o cloramfenicolo, o cloramfenicolo + gentamicina, o oxitetraciclina + gentamicina, immediatamente prima dell'uso, inibisce la crescita di gran parte dei batteri, inclusi i lattobacilli (batteri acidofili che possono costituire la flora dominante in certi prodotti alimentari).

PREPARAZIONE

- Sospendere 40,0 g di terreno disidratato (BK053HA) in 1,1 L di acqua distillata o deionizzata.
- Portare lentamente a ebollizione, agitando fino a completa soluzione.
- Distribuire 110 ml in flaconi da 150 ml.
- Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

ISTRUZIONI PER L'USO

- Fondere il terreno (se preparato anticipatamente).
- Raffreddare e mantenere il terreno a 47°C.
- In condizioni asettiche, aggiungere 1 ml di Oxytetracycline Antimicrobial Supplement (BS00808) ricostituito a ogni flacone contenente 110 ml di terreno di base.
- Mescolare con cura.
- Versare in piastre Petri sterili.
- Lasciare solidificare su una superficie fredda.
- Asciugare la superficie dell'agar, ponendo le piastre in termostato con i coperchi parzialmente aperti per il tempo strettamente necessario.
- Trasferire 0,1 ml del prodotto in esame, e le sue diluizioni seriali decimali, nelle piastre.
- Seminare l'inoculo sulla superficie dell'agar con un triangolo sterile.
- Incubare a 25°C per 3-5 giorni.

NOTA:

L' oxi-tetraciclina (BS00808) può essere sostituita da cloramfenicolo (BS02108), o cloramfenicolo + gentamicina (BS02108 + BS00908) o utilizzata in associazione con gentamicina (BS00908). Fare riferimento alle schede tecniche dei prodotti corrispondenti e alle norme riguardanti i prodotti in esame.

RISULTATI

Dopo l'incubazione contare separatamente lieviti e muffe.
Eseguire un rapido test di conferma al microscopio per ogni tipo di colonia osservata.

**COMPOSIZIONE TIPICA del terreno completo con Oxitetraciclina
(rettificabile per ottenere un rendimento ottimale)**

Per 1 litro di terreno:

- | | |
|----------------------------|-------|
| - Estratto di lievito..... | 5 g |
| - Glucosio..... | 20 g |
| - Oxitetraciclina | 0,1 g |
| - Agar batteriologico..... | 15 g |

pH del terreno pronto per l'uso a 25°C: 6,6 ± 0,2.

500 g di polvere consentono la preparazione di 13,7 litri di terreno.

CONTROLLO DI QUALITÀ

- Terreno disidratato: polvere di colore beige, omogenea e priva di grumi.
- Terreno preparato: agar di colore ambra.
- Tipica risposta della coltura dopo 72 ore di incubazione a 25°C su terreno completo addizionato con oxitetraciclina (CEN ISO/TS 11133-2: 2003):

MICROORGANISMI		CRESITA (RAPPORTO DI RENDIMENTO : P_R)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC® 9763	$P_R \geq 50\%$
<i>Candida albicans</i>	ATCC® 10231	$P_R \geq 50\%$
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC® 16404	$P_R \geq 50\%$
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922	inibita
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC® 6633	inibita

CONSERVAZIONE/STABILITÀ

Terreno disidratato : 2-30°C.

- La data di scadenza è indicata sull'etichetta.

-

Terreno preparato (valore indicativo) :

- Terreno di base in flacone : 6 mesi a 2-8°C.
- Terreno completo in piastre : 15 giorni a 2-8°C.

Oxytetracycline Selective Supplement

Gentamicin Antimicrobial Supplement

Chloramphenicol Selective Supplement

- Conservare a 2-8°C, al riparo dalla luce.
- La data di scadenza è indicata sulle etichette.

BIBLIOGRAFIA

- Mossel, D.A.A., Visser, M., and Mengerink, W.H.J. 1962. A comparison of media for the enumeration of moulds and yeasts in foods and beverages. Lab. Pract., 109-112.
- Buttiaux, R., et Catsaras, M. 1965. L'analyse bactériologique des bières. Ann. Inst. Pasteur, 16: 167.
- Sainclivier, M., et Roblot, A.M. 1966. Choix d'un milieu de culture pour le dénombrement des levures et moisissures dans le beurre. Ann. Inst. Pasteur, 17: 181.
- Journal Officiel (French) du 8 août 1972. Dénombrement des levures et des moisissures dans les produits cosmétiques. 8553-8554.
- NF V 03-454. December 1981. Agricultural food products. Spices and condiments. Enumeration of yeasts and moulds.
- IFF ISO 7954. August 1988. Microbiology. General guidance for enumeration of yeasts and moulds. Colony count technique at 25°C.
- FIL-IDF 94 B: 1991. Milk and milk products. Yeasts and moulds.
- NF ISO 13681. April 1996. Meat and meat products. Enumeration of yeasts and moulds. Colony count technique.
- NF V V08-059. November 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Enumeration of yeasts and moulds by colony-count technique at 25°C - Rou method.

PRESENTAZIONE

OXYTETRACYCLINE GLUCOSE AGAR BASE

Confezione	500 g (13,7 litri di terreno finale)
Codice	BK053HA

OXYTETRACYCLINE SELECTIVE SUPPLEMENT

Confezione	10 flaconi (x 500 ml ciascuno)
Codice	B500808

GENTAMICIN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

Confezione	10 flaconi (x 500 ml ciascuno)
Codice	B500908

CHLORAMPHENICOL SELECTIVE SUPPLEMENT

Confezione	10 flaconi (x 500 ml ciascuno)
Codice	B502108

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare per prime le persone che mi hanno aiutato nella realizzazione di questa tesi.

Ringrazio quindi il Prof. Catellani Paolo per avermi accettata come tesista e per essere stato sempre presente e disponibile in questo lungo periodo con infinita pazienza e disponibilità mi ha seguita in laboratorio e nella stesura di questa tesi; ringrazio inoltre tutti i tesisti che in questo periodo di studi si sono susseguiti all'interno del laboratorio di ispezione degli alimenti del dipartimento di sanità e igiene pubblica.

Vorrei ringraziare ora le persone che mi affiancano quotidianamente che mi hanno donato parte del loro tempo, attenzione, serenità e affetto.

Sono stati tre anni difficili ricchi di momenti forti che hanno allontanato da noi delle persone care.

Grazie a nonno Rema e alla nonna Pia per avermi insegnato i veri valori della vita donandomi una bellissima famiglia con la quale passare momenti di felicità e allegria. Un grazie a mamma e papà che con un semplice sguardo mi sanno capire e rassicurare quando ne ho bisogno e non mancano di regalarmi affetto e stima; con una semplice chiamata, parola e abbraccio mi riscaldano il cuore.

Un grazie speciale a Fe che è al mio fianco nella quotidianità condividendo tanti momenti insieme e oltre un'amica è la sorellina che tutti vorrebbero al loro fianco per proteggere e rasserenare. Mi ha sempre sostenuto nelle mie decisioni e aiutato a vedere con lucidità ciò che non sempre riuscivo a vedere.

Grazie alla sorella Vale che in ogni modo e momento in questi tre anni si è dimostrata una confidente e amica speciale con la quale passare momenti di tanta serenità tante serate a chiacchierare dove tra una battuta e una presa in giro faceva trasparire tra le sue parole tanto affetto. Grazie ad Anita e Eros che mi hanno dato la gioia di Marica una nipote fantastica che per le poche ore passate assieme mi dà la forza di affrontare anche la più difficile delle settimane.

Un grosso abbraccio a tutte le persone che mi vogliono bene e che mi hanno regalato anche un semplice sorriso, alle zie e tutti coloro che mi hanno supportato in questa esperienza e nella vita, un grazie anche a quelle persone come Mauro che si sono avvicinate da poco a me e alla mia famiglia e mi auguro possiamo passare tanti momenti sereni insieme. Grazie a tutti per avermi aiutato a crescere, sono sicura che continuerete a farlo. Vi voglio bene!!

Grazie