



Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

**Corso di Laurea Magistrale in
Medicina Veterinaria**

Tesi di Laura

**PRIMI ISOLAMENTI DI *PSEUDOMONAS SPP.* E
PSEUDOMONAS FLUORESCENS NEL CONTENUTO
INTESTINALE DI VACCHE LATTIFERE. POSSIBILI
NESSI CAUSA EFFETTO CON LE COLORAZIONI
ANOMALE DEI FORMAGGI**

Relatore: Prof. Valerio GIACCONE

Correlatori: Dott. Leonardo ALBERGHINI

Dott.sa Ioanna - Lucia RADU

Laureando: PAOLO PADOVAN

Matricola: 582938 – MV

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

| | Pag. |
|--|-------------|
| 1. INTRODUZIONE..... | 4 |
| 2. RASSEGNA BIBLIOGRAFICA..... | 7 |
| 2.1 Caratteristiche biocenotiche di <i>Pseudomonas</i> | 7 |
| 2.1.1 Inquadramento tassonomico del genere <i>Pseudomonas</i> | 7 |
| 2.2 <i>Pseudomonas spp.</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i> nell'uomo..... | 17 |
| 2.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nell'uomo..... | 17 |
| 2.2.2 Forme cliniche di <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nell'uomo..... | 18 |
| 2.2.3 Altre <i>Pseudomonas</i> responsabili di malattia nell'uomo..... | 25 |
| 2.2.4 <i>Burkholderia cepacia</i> nell'uomo..... | 25 |
| 2.3 <i>Pseudomonas spp.</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i> negli animali..... | 28 |
| 2.3.1 Infezioni da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> negli animali..... | 28 |
| 2.4 <i>Pseudomonas spp.</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i> nell'igiene degli alimenti..... | 32 |
| 2.4.1 Fisiologia di <i>Pseudomonas</i> | 34 |
| 2.4.2 Fonti d'inquinamento degli alimenti..... | 35 |
| 2.4.3 <i>Pseudomonas</i> come causa di modificazione di colore degli alimenti..... | 39 |
| 2.4.4 <i>Pseudomonas</i> e salute umana..... | 41 |
| 2.4.5 Prevenzione dei fattori d'alterazione degli alimenti..... | 43 |
| 2.4.6 Contaminazioni microbiche degli alimenti..... | 44 |
| 2.5 Flora microbica intestinale dei bovini con particolare riferimento alle lattifere..... | 51 |
| 2.5.1 Flora microbica intestinale dei bovini con particolare riferimento alle lattifere..... | 51 |
| 2.5.2 Flora microbica del ruminante..... | 55 |
| 2.6 I bovini come portatori asintomatici di batteri patogeni e alteranti per gli alimenti..... | 62 |
| 2.6.1 I patogeni emergenti e il latte crudo..... | 65 |
| 2.6.2 <i>E. coli</i> O157:H7..... | 66 |
| 2.6.3 Salmonellosi..... | 66 |
| 2.6.4 <i>Listeria monocytogenes</i> | 68 |
| 2.6.5 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. Paratuberculosis..... | 69 |
| 2.6.6 <i>Reservoir</i> di patogeni emergenti nel latte crudo..... | 69 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 2.6.7 | Microorganismi alteranti..... | 71 |
| 2.7 | Flora microbica del latte di vacca..... | 76 |
| 2.7.1 | Latte..... | 76 |
| 3. | PARTE SPERIMENTALE..... | 85 |
| 3.1 | Materiali e Metodi..... | 85 |
| 3.1.1 | Obiettivo della tesi..... | 85 |
| 3.1.2 | Materiali..... | 86 |
| 3.1.3 | Metodi..... | 87 |
| 3.2 | Risultati..... | 97 |
| 4. | CONCLUSIONI..... | 115 |
| 5. | RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI..... | 118 |
| 5.1 | Bibliografia..... | 118 |
| 5.2 | Webgrafia..... | 122 |

1. INTRODUZIONE

Il latte e i prodotti derivati sono una delle principali fonti di proteine nobili che noi abbiamo, specialmente come paesi occidentali. Soprattutto in Italia, i prodotti lattiero-caseari hanno avuto una lunga tradizione, alcuni risalgono sin all'Alto Medioevo.

Molti dei nostri formaggi sono talmente famosi, talmente radicati nella nostra tradizione culturale e alimentare che hanno acquisito una grande fama anche a livello mondiale e hanno ottenuto una D.O.P (Denominazione di Origine Protetta).

Attualmente sono 33 i prodotti lattiero-caseari di origine protetta solamente in Italia.

Il latte e i prodotti derivati costituiscono un'ottima fonte di nutrimento per l'uomo. Sono presenti molto spesso nella razione alimentare umana. Per molti consumatori italiani ed europei, i formaggi rappresentano un fondamentale componente della dieta giornaliera.

Questa importanza è illustrata bene dal gran numero di prodotti lattiero-caseari presenti, in Italia ci sono ben 430 tipi di formaggi diversi, in Francia ce ne sono all'incirca altrettanti; insomma da sole Italia e Francia fanno all'incirca 900 tipi di formaggi, su un totale di 1600 tipi di formaggi conosciuti nel mondo.

L' Europa in generale, e l'Italia in particolare, hanno sempre fatto del latte e dei derivati una delle principali fonti di alimentazione e quindi anche di produzione. Le produzioni lattiero-casearie hanno anche un ruolo-economico.

L'Italia produce formaggi di gran pregio che poi esporta anche all'estero, come ad esempio Grana Padano e Parmigiano-Reggiano. Quindi i formaggi oltre ad essere una buona fonte di proteine, di nutrimento per l'uomo, sono anche un'importante voce nel bilancio economico del nostro comparto agricolo.

Sappiamo, però, che qualche volta i prodotti lattiero caseari possono diventare pericolosi per la salute umana, cioè possono contenere microorganismi patogeni, e sappiamo anche che qualche volta si possono alterare, cioè possono manifestare dei difetti che rendono il prodotto non più idoneo al consumo alimentare umano.

Per questi difetti, specialmente nei formaggi freschi, come sono lo stracchino e paste filate fresche, giocano un ruolo essenziale le modificazioni di colore, cioè le alterazioni cromatiche; alterazioni che portano il formaggio a prendere colori strani che non sono quelli suoi tipici. Sovente c'è stata una fortissima recrudescenza in Italia e più in generale in Europa di questi processi alterativi, che

hanno riguardato in primo luogo i formaggi a pasta filata freschi e che poi si sono estesi anche a prodotti come la ricotta, lo stracchino o anche ad altri formaggi a pasta molle.

Si tratta di alterazioni che sono note ormai da vari anni, non sono state conosciute per la prima volta solo nel 2010; erano datate già ben prima, già conosciute nei secoli passati.

Da qualche decennio sappiamo con certezza che simili processi alterativi cromatici sono provocati da microorganismi (batteri, lieviti o muffe).

In questi ultimi anni, probabilmente in base ad una serie di fattori concomitanti, si è notata una notevole recrudescenza di questi eventi, che ha dato luogo a una serie di scandali alimentari, che sovente hanno trovato vasto eco sui giornali. I mass-media hanno propagandato e hanno persino ingigantito molto le notizie di questi processi alterativi di colore strano un po' fra tutta la popolazione, causando un fuoco al comparto lattiero-caseario; perché ovviamente, i consumatori impauriti da quello che stava succedendo, dalle alterazioni cromatiche dei formaggi, tendevano a non comprarli più e quindi hanno determinato un calo nelle vendite di questi prodotti, e quindi ovviamente delle perdite considerevoli in questo comparto economico.

I dati dell'ultimo censimento sono drammatici. Infatti nel nostro paese, negli ultimi 10 anni, proprio a causa delle modificazioni di colore dei formaggi, e in particolare modo per le mozzarelle blu, 775.033 aziende agricole hanno cessato le proprie attività. Ciò significa che ogni giorno chiudono i battenti 215 aziende, circa 9 l'ora, circa una ogni 7 minuti. Solo nel Lazio, nell'ultimo decennio, il 50 % delle aziende che producono latte ha cessato la propria attività, e oggi, malgrado alcune grandi aziende abbiano aumentato i loro capi, la Regione Lazio conta il 25% di capi da latte in meno rispetto al precedente censimento. Nel 2010, ad esempio, sempre la Regione Lazio, ha esportato all'estero prodotti lattiero-caseari per 207 milioni di euro, ma ne ha importati per 630 milioni, con un saldo negativo di 423 milioni di euro.

Da cosa sono date queste modificazioni di colore dei formaggi?

Sappiamo che ci possono essere vari batteri, o lieviti o muffe che possono dare colori strani ai formaggi in generale e ai formaggi freschi in particolare.

Sappiamo che a dare colorazioni rosate, o rossastre sono soprattutto lieviti come *Rhodotorula*; tra i batteri sappiamo poi che ci sono batteri pigmentanti tra le Micrococcaceae, come sono *Micrococcus* e *Staphylococcus*, tra le Bacillaceae come sono alcuni *Bacillus*, sappiamo che ci sono batteri pigmentanti tra le Enterobacteriaceae, per esempio *Serratia*; ma sappiamo che soprattutto ci sono batteri pigmentanti all'interno del genere *Pseudomonas*, a partire da *Pseudomonas aeruginosa*, ma altre specie pigmentanti sono *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens*; anzi i grossi problemi o tutti quei casi di mozzarelle blu o celesti che si sono verificati in questi ultimi due anni, sono proprio da attribuire, quasi tutti a *Pseudomonas fluorescens*.

Pseudomonas fluorescens è un batterio piuttosto comune, sovente isolabile dall'ambiente, per

esempio dai terreni agricoli, dal pulviscolo atmosferico, dalle acque in particolare; probabilmente sono proprio le acque la principale via di trasmissione del batterio ai prodotti lattiero-caseari come i formaggi a pasta filata freschi o ad altri tipi di formaggi.

Sappiamo però che anche le lattifere albergano sul loro corpo, o nel loro intestino una serie di batteri che possono essere pericolosi per la salute umana o anche alteranti, come ad esempio la spore di *Clostridium* butirrici che possono arrivare ai formaggi tramite le lavorazioni e causare gonfiori tardivi ai formaggi a pasta dura, come il Grana, o il Parmigiano-Reggiano.

Che ruolo hanno, quindi, le lattifere come potenziali portatori asintomatici di batteri, quali sono questi batteri alteranti del genere *Pseudomonas* e in particolare *Pseudomonas fluorescens*?

Ci accorgiamo che in letteratura scientifica non ci sono molti dati; cioè non abbiamo molte ricerche sperimentali che illustrino qual è la prevalenza dei portatori asintomatici tra i bovini da latte di *Pseudomonas fluorescens*. Sappiamo che i bovini possono essere portatori di *Campylobacter enteropatogeni*; e che occasionalmente possono essere portatori asintomatici di ceppi enteroemorragici di *Escherichia coli*, nei bovini in particolare. Ma quanto ne sappiamo di *Pseudomonas fluorescens*? Pochissimo, perché il batterio è raramente patogeno per l'uomo, e quindi finora non si era sentito il bisogno di appurare quante *P. fluorescens* ci sono nel contenuto intestinale delle lattifere.

Lo scopo di questa tesi è stato di verificare quale potesse essere la prevalenza dei capi portatori asintomatici di *P. fluorescens* tra le vacche da latte in un comprensorio piuttosto grande e a buona vocazione lattifera com'è il Veneto, nonché di verificare quale possa essere il ruolo delle lattifere, come potenziali diffusori di *P. fluorescens* al latte crudo, e quindi alla filiera produttiva dei formaggi.

2. RASSEGNA BIBLIOGRAFICA

2.1 Caratteristiche biocenotiche di *Pseudomonas*.

2.1.1 Inquadramento tassonomico del genere *Pseudomonas*.

Famiglia Pseudomonadaceae

Comprende microorganismi di forma bastoncellare, con corpo diritto o leggermente incurvato, mobili per flagelli polari. Gram negativi, non acido resistenti, i cui caratteri fondamentali sono:

Tab 1. Caratteri fondamentali delle Pseudomonodaceae (Tiecco, 2000).

| | |
|-------------------|--|
| Metabolismo | Ossidativo (Ox) e mai fermentativo; alcune specie sono inerti o alcalinizzanti |
| Tipo respiratorio | Aerobi stretti (A) |
| Catalasi | Positiva |
| Ossidasi | Generalmente positiva |
| Cromogenesi | Molte specie producono pigmenti solubili o non in acqua |

Sviluppano, normalmente bene, su tutti i comuni terreni culturali e a temperature comprese tra 4 e 43°C.

La famiglia riveste una notevole importanza sia perché comprende specie patogene (*P. mallei*) oppure occasionalmente patogene (*P. pseudomallei*, *P. aeruginosa*) sia soprattutto, per i notevoli danni economici da essi arrecati essendo tra i maggiori responsabili dei processi alterativi dei vari alimenti, in particolare di quelli conservati a bassa temperatura.

Merita infine di essere ricordato il fatto che in questi ultimi anni è stato osservato che certi alimenti fermentati a base di soia, arachidi, ecc. contaminati con *P. cocovenenans* sono in grado di provocare fatti morbosi nell'uomo (ipoglicemia, spasmi, incoscienza e a volte morte) in seguito alla formazione nel prodotto di due diverse tossine (*ac. bongrek* e *tossiflavina*) da parte di questo

microorganismo.

Genere *Pseudomonas*

Il genere *Pseudomonas* (dal greco *pseudo*= variabile e *monas*= forma) comprende un gran numero di batteri ecologicamente ed economicamente significativi. Morfologicamente si presentano sotto forma di elementi bastoncellari, dritti o leggermente incurvati, in genere di dimensione piuttosto piccole (0,5-1,0*1,5-4,0 micron). Le dimensioni, tuttavia possono presentare notevoli variazioni; anche nello stesso ceppo possono trovarsi forme coccobacillari e decisamente bacillari.

Asporigeni acapsulati, anche se secondo alcuni ricercatori la maggior parte delle specie produrrebbe un sottile strato viscoso addossato alla parete cellulare. Molte specie producono un pigmento idrosolubile fluorescente, in particolare se coltivate in terreni poveri in ferro, come pure pigmenti bleu, rossi, gialli o verdi insolubili. Almeno 4 specie contengono caroteni nell'interno della loro cellula. In terreni particolari, specie se ricchi in composti aromatici o eterociclici, danno origine alla formazione di metaboliti colorati.

La maggior parte delle specie, comprese quelle patogene, non richiedono per lo sviluppo l'aggiunta ai terreni di fattori di crescita, mentre altre richiedono l'aggiunta di vitamine o aminoacidi. Sono in grado di utilizzare una grande varietà di composti organici come unica fonte di carbonio.

Molte specie utilizzano gli alcoli e gli zuccheri ossidativamente, specie se presenti in elevate concentrazioni, con produzione di soli acidi. Possono accumulare nell'interno della cellula polibetaidrossibutirrato o polisaccaridi come riserva di carbonio, specialmente in terreni poveri d'azoto. Le esigenze termiche per lo sviluppo variano notevolmente; la temperatura ottimale è intorno ai 30°C ma possono sviluppare, a seconda della specie, a temperature comprese tra 4 e 43°C. Fatta eccezione per le specie patogene, tuttavia, sono da considerare delle specie psicrotrofe.

Crescono bene in ambiente neutro o alcalino (pH 7,0-8,5) e non sono in grado di riprodursi quando il pH scende sotto 6,0.

Le specie isolate dalle acque marine possono richiedere per lo sviluppo l'aggiunta di almeno l'1% di NaCl nei terreni colturali.

Vi sono specie recettive all'infezione fagica; talvolta lo spettro di recettività è molto stretto, interessando solo ceppi della stessa specie (*P. aeruginosa*), alte volte invece è piuttosto ampia.

Sono microorganismi largamente diffusi in natura rinvenendosi nel suolo e nelle acque dove provvedono attivamente al processo di mineralizzazione della materia organica. Molte specie presentano potere patogeno per i vegetali; altre sono patogene od occasionalmente patogene per i

mammiferi (*P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. caviae*), per i pesci e i rettili (*P. reptilivora*, *P. ichtyodermis*, *P. piscicida*).

La maggior parte delle specie appartenenti al genere *Pseudomonas*, siano esse pigmentanti oppure no, sono responsabili della comparsa di processi alterativi degli alimenti ricchi in sostanze proteiche soprattutto quando sono conservati in ambiente refrigerato.

Molti ricercatori, infine, hanno descritto focolai di tossinfezione alimentare in cui l'agente eziologico sarebbe appunto rappresentato da questi microorganismi; pur tuttavia, almeno, per il momento, non esiste in letteratura una dimostrazione inconfutabile della loro capacità di provocare tossinfezione nell'uomo, fatta eccezione per *P. cocovenenans*.

Questi microorganismi, come del resto tutti quelli capaci di ridurre i nitrati (enterobatteri, stafilococchi, *B. subtilis*, *Cl. perfringens*, ecc...) possono provocare anche fenomeni di avvelenamento da nitriti (metemoglobinemia), specialmente nei bambini, nei casi in cui l'alimento incriminato contenga elevate concentrazioni di questi.

Tutte le specie di questo genere rivestono una grandissima importanza economica essendo una delle cause più frequenti dei processi alterativi degli alimenti in genere e di quelli conservati con il freddo in particolare. Recentemente alcune specie di *Pseudomonas*, sulla base degli studi sul DNA, sono state riclassificate nel genere *Alteromonas* i quali molto spesso sono causa di alterazione caratterizzata dalla comparsa di odore ammoniacale del pollame e dei pesci.

In agar le colonie sono rugose, lisce o mucose. Le forme cromogene danno origine a colonie con margini irregolari sulle quali si possono notare placche paragonabili a quelle prodotte dai fagi, dovute all'azione di enzimi proteolitici elaborati dal germe stesso. Le forme apigmentate danno colonie paragonabili a quelle degli enterobatteri con le quali spesso vengono confuse.

In brodo lo sviluppo è caratterizzato da un intorbidimento uniforme del liquido colturale con formazione di una sottile pellicola superficiale e, a volte, di un leggero sedimento sul fondo della provetta (Tiecco, 2000).

I ceppi apigmentati possono facilmente essere confusi con altri germi Gram negativi, dai quali tuttavia si differenziano facilmente per la rapidità con cui idrolizzano.

Il loro sviluppo viene inibito da un basso a_w , pertanto nei prodotti anche leggermente essiccati non sono in grado di moltiplicarsi. Se i valori di a_w scendendo ancora si determina addirittura una riduzione del numero di questi batteri. Sono sensibili ai vari disinfettanti alle comuni dosi d'impiego (non però ai sali quaternari d'ammonio) e alle radiazioni. Sono moderatamente sensibili alla penicillina.

Largamente distrutti in natura, possono venire a contatto con gli alimenti in vario modo, in particolare con l'acqua e con il pulviscolo sospeso nell'aria. Sono microorganismi di grandissima importanza in batteriologia alimentare, in particolare per le carni e altri alimenti conservati a basse

temperature nei quali divengono la flora predominante nel corso della conservazione avendo a queste temperature una velocità di crescita notevolmente più breve rispetto agli altri psicrofili. A questa regola fanno eccezione *Streptococcus liquefaciens* ed *Alteromonas putrefaciens*, le quali, possono diventare la flora predominante nel caso in cui, però, le carni presentino un pH elevato. A 4°C gli *Pseudomonas* presentano un tempo di duplicazione di 7 giorni.

Sono presenti in ogni prodotto alimentare ed in particolare *P. fragi* e *P. lundensis* nelle carni, *P. fluorescens*, *aeruginosa* e *putida* nel latte, *P. fragi* nella crema e nel burro (Tiecco, 2000).

Tab 2. Specie e sottospecie del genere *Pseudomonas* (da Tayeb *et al.*, 2005).

| Specie | Sottospecie |
|-------------------------------|---|
| Gruppo <i>P. aeruginosa</i> | <i>P. aeruginosa</i> <i>P. alcaligenes</i> <i>P. anguilliseptica</i> <i>P. argentinensis</i> <i>P. borbori</i> <i>P. citronellolis</i> <i>P. flavescens</i> <i>P. mendocina</i> <i>P. nitroreducens</i> <i>P. oleovorans</i> <i>P. pseudoalcaligenes</i> <i>P. resinovorans</i> <i>P. straminea</i> |
| Gruppo <i>P. chlororaphis</i> | <i>P. aurantiaca</i> <i>P. aureofaciens</i> <i>P. chlororaphis</i> <i>P. fragi</i> <i>P. lundensis</i> <i>P. taetrolens</i> |

| | |
|--------------------------------|--|
| Gruppo <i>P. fluorescens</i> | <i>P. antarctica</i> <i>P. azotoformans</i> “ <i>P. blatchfordae</i> ” <i>P. brassicacearum</i> <i>P. brenneri</i> <i>P. cedrina</i> <i>P. corrugata</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. gessardii</i> <i>P. libanensis</i> <i>P. mandelii</i> <i>P. marginalis</i> <i>P. mediterranea</i> <i>P. meridiana</i> <i>P. migulae</i> <i>P. mucidolens</i> <i>P. orientalis</i> <i>P. panacis</i> <i>P. proteolytica</i> <i>P. rhodesiae</i> <i>P. synxantha</i> <i>P. thivervalensis</i> <i>P. tolaasii</i> <i>P. veronii</i> |
| Gruppo <i>P. pertuginogena</i> | <i>P. denitrificans</i> <i>P. pertuginogena</i> |
| Gruppo <i>P. putida</i> | <i>P. cremoricolorata</i> <i>P. fulva</i> <i>P. monteilii</i> |

| | |
|---------------------------|---|
| | <i>P. mosselii</i> <i>P. oryzihabitans</i> <i>P. parafulva</i> <i>P. plecoglossicida</i> <i>P. putida</i> |
| Gruppo <i>P. stutzeri</i> | <i>P. balearica</i> <i>P. luteola</i> <i>P. stutzeri</i> |
| Gruppo <i>P. syringae</i> | <i>P. amygdali</i> <i>P. avellanae</i> <i>P. caricapapayae</i> <i>P. cichorii</i> <i>P. coronafaciens</i> <i>P. ficuserectae</i> “ <i>P. helianthi</i> ” <i>P. meliae</i> <i>P. savastanoi</i> <i>P. syringae</i> “ <i>P. tomato</i> ” <i>P. viridiflava</i> |

La loro importanza in batteriologia alimentare risiede nel fatto che:

- utilizzano come fonte di energia vari composti organici del carbonio (anche semplici) e come fonti di materiali plastici composti azotati inorganici;
- sono in grado di sintetizzare tutti i fattori di crescita loro necessari;
- sviluppano a basse temperature e quindi possono crescere sui prodotti alimentari conservati con il freddo. Essendo aerobi stretti, sviluppano sulla superficie dei cibi determinando viscosità;
- producono varie sostanze aromatiche poco gradevoli;
- sono produttori di enzimi responsabili della comparsa di fenomeni alterativi nei prodotti conservati, in particolare carne e latte:

a) *proteasi* - esoenzimi prodotti durante la fase esponenziale e all'inizio della fase stazionaria di crescita ad una temperatura ottimale di 18-21°C; esistono, tuttavia, ceppi in grado di produrre queste proteasi anche a 5°C. Le proteasi sono dei metalloenzimi con peso molecolare compreso tra 23.000 e 50.000, termostabili presentando un D_{140} compreso tra 0,5 e 1'.

La temperatura ottimale perché questi enzimi svolgano la propria attività è 30-45°C ed il pH 6,5-8,0.

Possono provocare difetti nel latte UHT e sterilizzato quali gelificazione, sedimento, e gusto amaro come pure diminuzione della resa nella produzione del formaggio. Attaccano, in ordine decrescente, le caseine κ , β e αS_1 ;

b) *lipasi* – vengono prodotte alla temperatura ottimale di 8°C e pH 7,0. Hanno un peso molecolare di 30.000 D. La temperatura ottimale di attività è 30-50°C e di pH 7,0-9,0. Anche le lipasi sono termostabili ma questa stabilità è notevolmente inferiore alle proteasi; infatti, perdono dal 15 al 56 % di attività a 63°C per 30' o dall'1,5 al 41% a 72°C per 17". Alcune di queste lipasi agiscono sui fosfolipidi dei globuli del grasso (Tiecco, 2000).

Provocano cambiamenti di aroma nel latte;

- sono cromogeni e quindi possono determinare colorazioni superficiali degli alimenti. *P. aeruginosa* e *Ser. marcescens* sono in grado di produrre una pigmentazione bruna in terreni contenenti tiramina. Alcuni ricercatori hanno avanzato l'ipotesi che questi germi possano giocare un ruolo nell'imbrunimento microbico degli alimenti ricchi in tiramina. *P. fragi* e *Shewanella putrefaciens* sono in grado di produrre un pigmento extracellulare diffusibile quando coltivati in terreni colturali contenenti tirosina. Secondo alcuni ricercatori questi germi potrebbero essere

responsabili della colorazione bruna (melanosi) dei gamberi ed a conferma di questa ipotesi sono stati in grado di riprodurre questa colorazione in brodi di gamberi seminati sperimentalmente con questi microorganismi (Tiecco, 2000).

I caratteri morfologici, fisiologici e biochimici del genere sono:

Tab 3. Caratteri fondamentali del genere *Pseudomonas* (Tiecco, 2000).

| | |
|----------------------------------|--|
| Morfologia | Bastoncini dritti o incurvati |
| Mobilità | Positiva per ciglia polari (p) (mono- o lofotrichi) |
| Metabolismo | Ossidativo (Ox), alcune specie sono inerti e altre alcalinizzanti (I-AI) |
| Gas da glucosio | Negativo, lo zucchero viene ossidato con produzione di solo acido |
| Tipo respiratorio | Aerobio (A) fatta eccezione per quelle specie che possono usare il processo di denitrificazione come mezzo di respirazione anaerobica |
| Comportamento in agar lattosato | Nessun viraggio del terreno, il lattosio non viene attaccato |
| Potere saccarolitico | Scarso o nullo perché questi microorganismi utilizzano poco gli idrati di carbonio. La prova va eseguita in terreni privi di peptone; questo composto infatti viene scisso con produzione di grandi quantità NH_3 che neutralizza gli eventuali acidi prodotti. |
| Produzione di acido lattobionico | Positivo lento o negativo |
| Indolo | Variabile; la prova va eseguita in acqua peptonata (T_{13}) addizionata di 0,03% di triptofano |
| HS in Kigler | Negativo o positivo |
| Catalasi | Positiva |
| Ossidasi | Positiva, solo pochi ceppi deboli o negativi |
| Cromogenesi | Variabile. Molte specie producono pigmenti fluorescenti diffusibili. Si ha pure produzione di pigmenti, solubili o non, bleu, rossi, gialli o verdi. <i>P. aeruginosa</i> produce un pigmento verde (piocianina) solubile in acqua e in cloroformio (la fluorescina non è solubile in cloroformio) |

| | |
|-------------------------------------|--|
| Produzione di ac. 3-chetolattionico | Negativa |
| NH ₃ da arginina | Con la procedura di Tornley si ha positività nei due tubi seminati. In brodo arginina l'azione idrolitica di questi germi si manifesta molto più rapidamente che non quella degli altri germi Gram negativi; tuttavia i ceppi patogeni per le piante sono spesso arginina negativi |
| Temperatura ottimale | Sono germi tipicamente psicrotrofi. Sono le specie patogene o occasionalmente patogene per i mammiferi, hanno un ottimo di crescita a 37°C e solo <i>P. aeruginosa</i> sviluppa ancora a 42°C |

Alcuni ceppi che producono pigmenti fluorescenti, in terreno di Willis (T₄₇) danno origine ad una zona opalescente intorno alla colonia (idrolisi della lecitina) e ad uno strato perlaceo sulla colonia (lipolisi). La reazione è meglio evidenziata, versando sulla piastra una soluzione satura di solfato di rame; gli acidi grassi formati, reagendo con il solfato di rame, danno origine ad un precipitato blu-verdastro per formazione appunto dei relativi sali di rame. L'identificazione delle varie specie appartenenti a questo genere non è semplice e richiede il ricorso a laboratori specializzati (Tiecco, 2000).

Tab. 4. Caratteri biochimici di alcune specie appartenenti al genere *Pseudomonas*. (Tiecco, 2000).

| | <i>P. aeruginosa</i> | <i>P. fluorescens</i> | <i>P. putida</i> | <i>P. cepacia</i> | <i>P. stutzeri</i> | <i>P. maltophilia</i> |
|--------------------------|----------------------|-----------------------|------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|
| Ossidasi | + | + | - | v | + | - |
| Produzione di piocianina | + | - | - | - | - | - |
| Produzione di pioverdine | + | + | + | - | - | - |
| Sviluppo a 42°C | + | - | - | v | + | v |

| | | | | | | |
|------------------|---|---|---|---|---|---|
| Lisina | - | - | - | + | - | + |
| Arginina | + | + | + | - | - | - |
| Acetamide | + | - | - | v | - | - |
| Nitrati | + | v | - | v | + | v |
| Denitrificazione | + | - | - | v | + | v |

Tab. 5. Caratteri differenziali con altri germi gram negativi (Tiecco, 2000).

| | <i>Pseudomonas</i> | <i>Aeromonas</i> | <i>Alcaligenes</i> | Enterobatteri |
|--|--------------------|------------------|--------------------|---------------|
| Test O/F | Ox (I-AI) | F | Ox | F |
| Tipo respiratorio | A | A-An | A | A-An |
| Ciglia | p | p | Pe | Pe |
| Ossidasi | + | + | + | - |
| NH ₃ da arginina (secondo Tornley) | (-) | | (+) | |
| Sviluppo a 42°C | - (°) | + | - | + |
| Sensibilità 5 UI penicillina | - | v | + | |

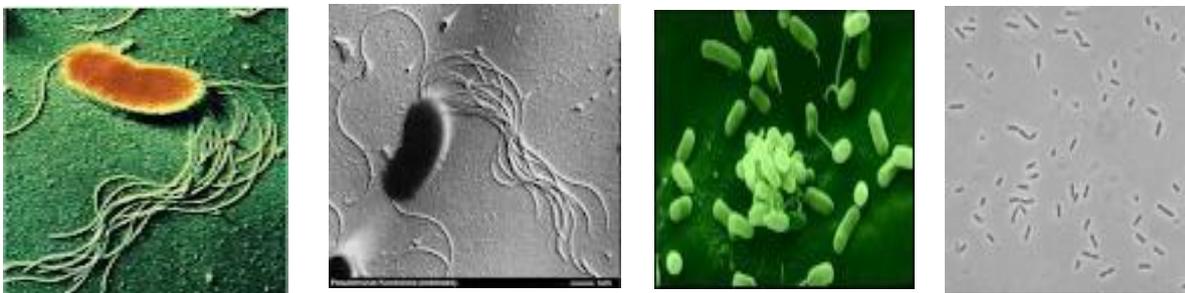


Fig 1 - Foto a diversi ingrandimenti microscopici di *Pseudomonas fluorescens*.

- **Ceppi produttori di pigmenti fluorescenti (Tiecco, 2000)**

1. *Presenza di arginina-deidrolasi. Batteri saprofiti o patogeni animali:*

P. aeruginosa

P. fluorescens

P. chlororaphis

P. aureofaciens

P. putida

- **Ceppi non produttori di pigmenti fluorescenti (Tiecco, 2000)**

1. *Idrolizzano il glucosio:*

P. stutzeri

P. mendocina

2. *Non idrolizzano il glucosio:*

P. alcaligenes

P. pseudoalcaligenes

2.2 *Pseudomonas* spp. e *Pseudomonas fluorescens* nell'uomo

2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa* nell'uomo

Gli *Pseudomonas* sono ubiquitari e preferiscono gli ambienti umidi. Nell'uomo la specie più comune è *P. aeruginosa*. Altre specie che talora possono provocare infezioni umane sono *P. paucimobilis*, *P. putida*, *P. fluorescens* e *P. acidovorans*. *P. aeruginosa* si può ritrovare occasionalmente nelle regioni ascellare e anogenitale di una cute normale, ma solo di rado nelle feci, a meno che non sia stata somministrata una terapia antibiotica. Il microrganismo è spesso un contaminante di lesioni popolate da microrganismi più virulenti, ma talvolta provoca infezione in tessuti esposti all'ambiente esterno. Le infezioni da *Pseudomonas* di solito si verificano negli ospedali, dove i microrganismi si ritrovano di frequente nei lavandini, nelle soluzioni antisettiche e nei recipienti per urine. Si può verificare la trasmissione ai pazienti da parte del personale sanitario sano, soprattutto nel caso degli ustionati e nei reparti di terapia intensiva neonatale. Altre specie, precedentemente classificate come *Pseudomonas*, sono importanti patogeni nosocomiali, quali

Burkholderia cepacia e *Stenotrophomonas maltophilia*.

La maggior parte delle infezioni provocate da *P. aeruginosa* si verifica in pazienti ospedalizzati debilitati o immunocompromessi. *P. aeruginosa* è la seconda causa più frequente di infezioni nei reparti di terapia intensiva e una frequente causa di polmoniti associate ai ventilatori. Oltre ad acquisire infezioni in ambito ospedaliero, i pazienti con infezione da HIV sono a rischio di acquisire in comunità infezioni da *P. aeruginosa* e spesso, quando contraggono l'infezione, presentano segni di infezione da HIV avanzata (www.msd-italia.it/altre/manuale/sez13/1571264.html).

Le infezioni da *Pseudomonas* possono colpire molte sedi come cute, tessuti sottocutanei, ossa, orecchie, occhi, tratto urinario e valvole cardiache. La sede varia a seconda della porta d'ingresso e della vulnerabilità del paziente. Negli ustionati la regione al di sotto dell'escara si può infiltrare in modo abbondante con i microrganismi e servire da focolaio per una successiva batteriemia, rappresentando una complicanza delle ustioni spesso letale. Una batteriemia senza un focolaio urinario evidenziabile, soprattutto se dovuta a specie di *Pseudomonas* diverse da *P. aeruginosa*, deve far pensare alla possibilità di un'avvenuta contaminazione EV dei liquidi, dei farmaci o degli antisettici usati per l'applicazione di cateteri EV. Nei pazienti con infezione da HIV, *Pseudomonas* determina più frequentemente polmonite o sinusite (www.msd-italia.it/altre/manuale/sez13/1571264.html).

2.2.2 Forme cliniche da *Pseudomonas aeruginosa* nell'uomo

Il quadro clinico dipende dalla sede interessata. Nei pazienti ricoverati in ospedale si può verificare un'infezione polmonare associata a intubazione endotracheale, tracheotomia o trattamento RPPI quando *Pseudomonas* si sia unito ad altri bacilli e Gram negativi a colonizzare l'orofaringe. La bronchite da *Pseudomonas* è frequente nel decorso tardivo della fibrosi cistica; i germi isolati presentano una caratteristica morfologia mucoide delle colonie.

L'isolamento di *Pseudomonas* nel sangue è frequente nelle ustioni e nei pazienti con tumori maligni. La presentazione clinica è quella di una sepsi da Gram negativi, talvolta con l'aggiunta di

Ecthyma gangrenosum, caratterizzato da aree nero-violacee, di circa 1cm di diametro, con centro ulcerato ed eritema circostante che generalmente si rinviene nelle zone ascellari o anogenitali.



Fig 2 - Lesioni da *Ecthyma gangrenosum* associato a batteriemia da *Pseudomonas spp.*



Fig 3 - Lesioni da *Ecthyma gangrenosum* associato a batteriemia da *Pseudomonas spp.*

Pseudomonas è causa frequente di IVU (Infezione delle vie urinarie), specialmente in pazienti sottoposti a manipolazioni urologiche, affetti da uropatie ostruttive o che abbiano ricevuto antibiotici ad ampio spettro. La forma più frequente di infezione auricolare dovuta allo *Pseudomonas* è l'otite esterna con secrezione purulenta che si riscontra spesso nei climi tropicali.

Una forma più grave, chiamata otite esterna maligna, può svilupparsi nei diabetici; si manifesta con un dolore acuto all'orecchio, spesso con paralisi unilaterale del nervo cranico e richiede una terapia parenterale (www.msd-italia.it/altre/manuale/sez13/1571264.html).



Fig 4 - Otite esterna con secrezione purulenta da *Pseudomonas spp.* (sx) e otite esterna da *Pseudomonas spp.* (dx).

Un interessamento dell'occhio da parte dello *Pseudomonas* spesso si presenta come un'ulcerazione corneale conseguente a traumi, ma in alcuni casi la contaminazione si ha anche a partire da lenti a contatto o dai liquidi utilizzati per il loro uso.



Fig 5 - Ulcerazione corneale da *Pseudomonas spp.*

Il microrganismo può essere rinvenuto in fistole secernenti, specie dopo traumi o ferite da punta profonde ai piedi. Il liquido di drenaggio spesso ha un dolce odore di frutta. Molte di queste ferite da punta esitano in cellulite e osteomielite da *P. aeruginosa* e possono richiedere, in aggiunta agli

antibiotici, una tempestiva toelettatura chirurgica. Di rado *Pseudomonas* provoca endocardite: ciò avviene su protesi valvolari oppure nei pazienti che abbiano subito un intervento chirurgico a cuore aperto o anche sulle valvole naturali in chi fa uso di droghe EV. L'endocardite destra può essere curata con terapia medica, ma se l'infezione interessa la mitrale, le valvole aortiche o valvole protesiche, si dovrà spesso procedere all'asportazione della valvola infetta (www.msdi-italia.it/altre/manuale/sez13/1571264.html).



Fig 6 - Endocarditi ulcerative da *Pseudomonas spp.*

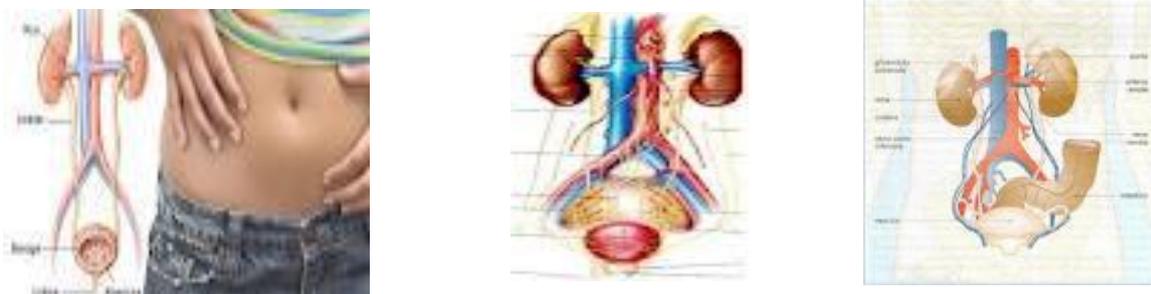


Fig 7 - Infezioni delle vie urinarie.

La malattia più grave nell'uomo, anche in età pediatrica, rimane comunque la fibrosi cistica, sulla quale molto è stato scritto. Sembra che l'ambiente polmonare selezioni un sottogruppo di varianti autoaggregative e ipercigliate, capaci di aderire, molto più tenacemente dei ceppi selvaggi, all'epitelio e, *in vitro*, ai terreni solidi o alla linea cellulare A549, anche se in laboratorio il fenomeno è meno intenso. I ceppi mucosi contenuti nella saliva dei malati sono capaci di sopravvivere fino a 8 giorni sulle superfici asciutte.

Questi morfotipi, che crescono con colonie più piccole, sono più mobili e più aggressivi. Nel

polmone *P. aeruginosa* vive in anaerobiosi, formando *biofilm* mucosi per la presenza di alginato, nel cui spessore riescono ad annidarsi dei conglomerati batterici irraggiungibili dai farmaci, dando origine al fenomeno della multi-resistenza agli antibiotici. Sembra che la limitazione dell'ossigeno, unita alla presenza di nitrati, contribuisca in maniera determinante alla tolleranza verso gli antibiotici all'interno dei *biofilm*. Gli esperimenti su modelli animali hanno provato che la gravità delle infezioni polmonari da *P. aeruginosa* è dovuta a stimolazione del sistema secretorio di tipo III (o TTSS), quando il germe viene a contatto con le cellule polmonari in ambiente povero di calcio e ricco di ferro. In queste situazioni il genoma di *P. aeruginosa* codifica il sistema secretorio di tipo III attraverso l'adenilato-ciclastasi, liberando una serie di proteine eso (proteine strutturali e proteine effettrici batteriche per il trasporto di tossine) S, T, Y ed U, causa della tossicità acuta verso le cellule epiteliali e i macrofagi (www.msd-italia.it/altre/manuale/sez13/1571264.html).

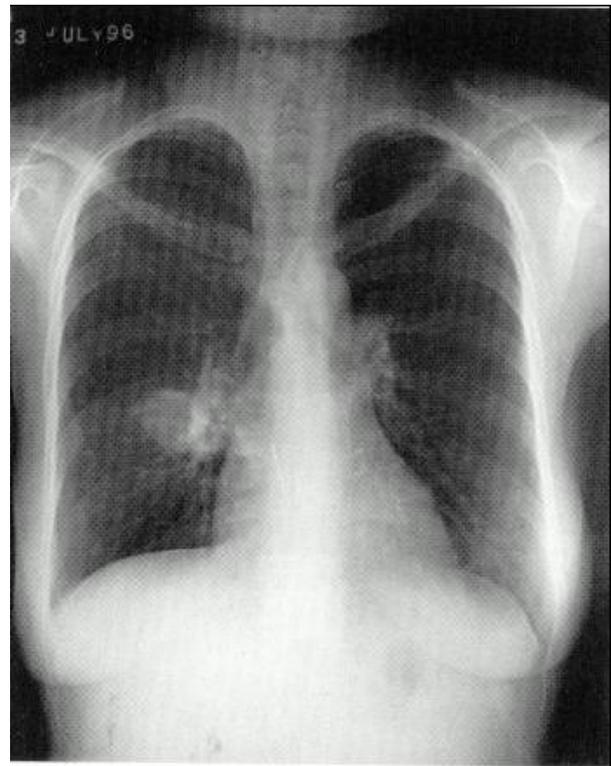
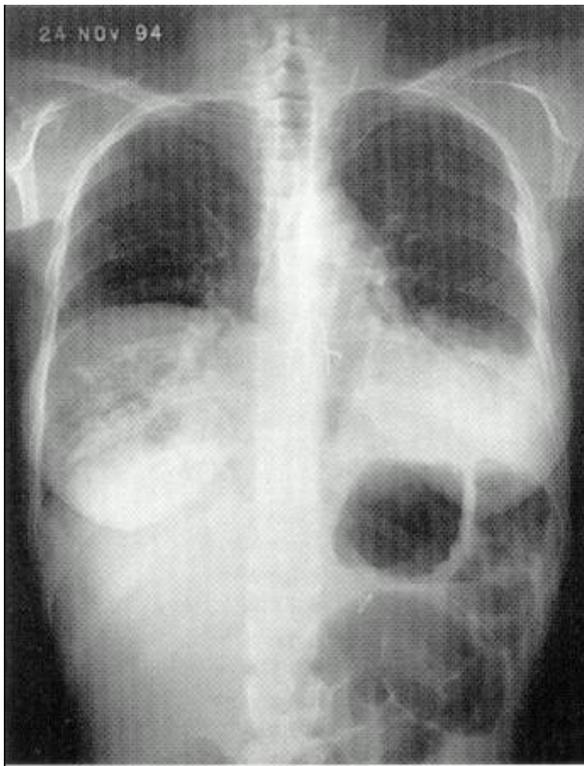


Fig 8 - Radiografie di polmoniti da *Pseudomonas spp.*

P. aeruginosa può causare, inoltre, infezioni gastroenteriche in bambini e adulti con forme ematiche maligne e neutropenia o quando i meccanismi di difesa immunitaria vengono alterati da trattamenti farmacologici, malattie croniche o età avanzata. E' descritta un'enterocolite necrotizzante per esposizione prolungata in ambiente ospedaliero o pressione selettiva degli antibiotici. Le ulcere necrotiche ed emorragiche, che in seguito ad invasione vascolare si estendono alla sottomucosa e alla sierosa, con conseguente peritonite perforante, possono interessare anche altre porzioni del tratto digerente. Si ricorda che questo microrganismo è responsabile del 50% delle infezioni ospedaliere, attraverso ceppi endemici e solamente epidemici. I principali serbatoi sono apparecchiature per la respirazione, endoscopi, nebulizzatori, spazzolini da denti, soluzioni detergenti e disinfettanti, lavandini, piscine per fisioterapia, piante ornamentali e fiori. La trasmissione dell'infezione avviene principalmente attraverso le mani del personale. I reparti maggiormente a rischio sono terapia intensiva e pediatria (www.msd-italia.it/altre/manuale/sez13/1571264.html).



Fig 9 - Follicolite da *Pseudomonas*.

Tab 6. *Pseudomonas aeruginosa* nell'uomo (Zavanella et al., 2004).

| Distretto interessato. | Vie d'infezione e conseguente malattia. |
|-------------------------------|---|
| Pelle | Ferite, ustioni, traumi chirurgici, infezioni da inoculazioni intravena, necrosi emorragica della cute o ectima gangrenoso. |
| Orecchio | Otite esterna dei nuotatori, otite interna dei diabetici |
| Occhio | Traumi operatori |
| Apparato uro-genitale | Infezioni delle vie urinarie da catetere o da irrigazioni |
| Apparato digerente | Diarrea nei bambini (febbre di Shanghai), forme diarroiche colera-simili, tiflite nei leucemici, ascessi rettali nei malati di tumore |
| Sistema circolatorio | Metaemoglobinemia |
| Sistema respiratorio | Polmonite necrotizzante da respiratori contaminati, infezioni da intubazione endotracheale, sindrome da <i>stress</i> respiratorio nell'adulto, fibrosi cistica |
| Sistema nervoso | Meningite da rachicentesi |

2.2.3 Altre *Pseudomonas* responsabili di malattia nell'uomo

Anche altre specie di *Pseudomonas* sono state considerate di volta in volta responsabili di aver provocato episodi tossinfettivi soprattutto nei bambini, tra i quali sono stati riportati anche casi mortali. Ad avvalorare questa ipotesi va ricordato che da vari ceppi di *Pseudomonas spp.* è stata isolata un'enterotossina termolabile (LT) e che da *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* addirittura un'enterotossina termolabile (LT) ed una termostabile (ST). Secondo Moustafà (2000), i ceppi isolati da casi di gastroenterite in Egitto sarebbero in grado, quando somministrati vivi o morti al gattino, di provocare in questo animale diarrea ed a volte vomito.

La sintomatologia sarebbe caratterizzata da nausea, vomito, crampi addominali e diarrea.

Anche se di scarso interesse nel nostro Paese, merita di essere ricordato che alcuni alimenti fermentati a base di soia, arachidi, ecc..., contaminati con *Burkholderia cocovenans* provocano gravi intossicazioni caratterizzate da ipoglicemia, spasmi, incoscienza, e morte. È stato dimostrato che questo germe è in grado di produrre due tossine (*tossoflavina e acido bongrek*) responsabili appunto di questa sintomatologia (Tiecco, 2000).

2.2.4 *Burkholderia cepacia* nell'uomo

Burkholderia cepacia appartiene alla categoria dei batteri Gram negativi non fermentanti ed è uno dei principali patogeni in fibrosi cistica. Conosciuto in biologia vegetale come "fitopatogeno", responsabile dei processi di putrefazione batterica delle erbe Gigliacee (a cui appartiene la cipolla, "cepa" in latino), è stato descritto come responsabile di infezioni nel genere umano solo in un numero limitato di patologie (principalmente fibrosi cistica e immunodeficienze). Originariamente classificato nel genere *Pseudomonas*, il germe, caratterizzato da elevata complessità tassonomica, è attualmente inquadrato in un genere a parte denominato *Burkholderia* (www.fibrosicisticaricerca.it/Fibrosi-Cistica/Domande-piu-frequenti/Burkholderia-cepacia-lessenziale-da-conoscere,2007).

Per il corretto isolamento sono necessari appropriati terreni di coltura. Talora la complessità tassonomica di *B. cepacia* e delle specie ad essa correlate contribuiscono a generare errori nell'identificazione, non sempre attribuibili a incapacità tecniche del laboratorio. In base ai dati dei registri nazionali di patologia, la prevalenza di questo germe nei fibrocistici è di gran lunga inferiore a quella di *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Secondo i dati del registro nord americano la fibrosi cistica, attualmente il 3,1% dei pazienti è infettato da *B. cepacia*. In alcuni centri è stata osservata una bassa prevalenza di questo patogeno, in altri invece sono state osservate vere e proprie diffusioni epidemiche, con un'alta percentuale di pazienti colonizzati (www.fibrosicisticaricerca.it/Fibrosi-Cistica/Domande-piu-frequenti/Burkholderia-cepacia-lessenziale-da-conoscere,2007).

Dalla colonizzazione dei pazienti affetti da fibrosi cistica, con questo tipo di germe possono derivare 3 quadri clinici fondamentali. Nel 40% circa dei casi il paziente alberga il germe senza mostrare sostanziali variazioni del decorso clinico della malattia. Un'analogia percentuale di

pazienti manifesta un progressivo, lento deterioramento delle condizioni generali. Nel 20% dei casi il paziente sviluppa un quadro clinico caratterizzato da febbre elevata, batteriemia e brusco quadro di deterioramento polmonare con esito fatale (sindrome da *B. cepacia*). *B. cepacia* appare quindi come un germe in grado di determinare quadri clinici disparati, talora temibili e scarsamente controllabili, per la spiccata resistenza agli antibiotici manifestata dal germe. Le ragioni dell'insorgenza di quadri clinici così disparati non sono completamente note, ma in parte sembrano attribuibili a caratteristiche variabili del germe. Complessi studi molecolari hanno sottolineato che quello che comunemente viene indicato come *B. cepacia* è in realtà un gruppo (oggi chiamato *B. cepacia* complex) di almeno 10 sottospecie (o genomovars) strettamente correlate e non discriminabili con le comuni tecniche microbiologiche. Le conoscenze sulla trasmissibilità e patogenicità dei vari genomovars sono ancora parziali. La maggior parte delle epidemie descritte sono sostenute dal genomovar II o III, tutti i genomovars sono caratterizzati da elevata trasmissibilità fra pazienti e sono in grado di determinare epidemie. Anche se il concetto di patogenicità deve esser tenuto distinto dal concetto di trasmissibilità, il genomovar II (*B. multivorans*) ma soprattutto il genomovar III (*B. cenocepacia*) si associano a un decorso clinico più severo. Il declino delle prove di funzionalità polmonare (FEV1), la morbilità e mortalità sono risultate più elevate in pazienti infettati da genomovars II e III rispetto a soggetti infettati da altri genomovars (www.fibrosicisticaricerca.it/Fibrosi-Cistica/Domande-piu-frequenti/Burkholderia-cepacia-lessenziale-da-conoscere,2007).

Come si verifica per la maggior parte dei patogeni propri della fibrosi cistica, una volta che le vie aeree dei pazienti risultano colonizzate da *B.cepacia* complex si assiste allo sviluppo di infezione cronica. Nel 20% circa dei casi il germe può essere responsabile di infezioni transitorie e talvolta può essere isolato dalle vie aeree solo per un limitato periodo di tempo(www.fibrosicisticaricerca.it/Fibrosi-Cistica/Domande-piu-frequenti/Burkholderia-cepacia-lessenziale-da-conoscere,2007).

Non sappiamo ancora con sicurezza quale sia la strategia di terapia antibiotica più efficace nei confronti di *B. cepacia* complex. Per quanto riguarda la terapia antibiotica, al primo isolamento del germe, al fine di tentarne l'eradicazione (terapia eradicante), esistono solo limitate esperienze. L'esperienza maturata finora non è tuttavia tale da poter raccomandare uno schema antibiotico valido nei confronti di tutti i genomovars. Inoltre, il pattern di resistenza agli antibiotici dei vari genomovars può essere estremamente vario e l'eventuale trattamento deve essere suggerito in base all'antibiogramma. Nel caso di una riacutizzazione respiratoria è opportuno ricorrere a cicli di terapia antibiotica per via parenterale. Contrariamente a quanto si verifica per *P. aeruginosa*,

quando le condizioni del paziente sono stabili non esistono indicazioni scientificamente documentate sull'opportunità di una terapia antibiotica soppressiva cronica(www.fibrosicisticaricerca.it/Fibrosi-Cistica/Domande-piu-frequenti/Burkholderia-cepacia-lessenziale-da-conoscere,2007).

Non potendo impedire la colonizzazione batterica dovuta all'incontro occasionale con il germe che, come altri Gram negativi non fermentanti, fa parte del nostro normale habitat, gli sforzi attuali devono essere finalizzati a "intercettare" quanto prima la colonizzazione, a tentarne l'eradicazione e a mettere in atto procedure di segregazione per prevenire le infezioni crociate all'interno dei centri (www.fibrosicisticaricerca.it/Fibrosi-Cistica/Domande-piu-frequenti/Burkholderia-cepacia-lessenziale-da-conoscere, 2007).

2.3 *Pseudomonas spp.* e *Pseudomonas fluorescens* negli animali

2.3.1 Infezioni da *Pseudomonas aeruginosa* negli animali

Pseudomonas aeruginosa, detta anche bacillo piociano, è un germe frequentemente coinvolto in situazioni patologiche sostenute in via primaria da altri microrganismi e solo di rado causa primaria di malattia. La sua attività patogena si manifesta anche in seguito a terapie immunodepressive o a prolungati trattamenti antibiotici in diverse specie animali e si estrinseca in flogosi a carattere

purulento, localizzate o diffuse, spesso ad esito letale.

Possiede fimbrie o pili retrattili a inserzione polare, che ne favoriscono l'attacco alle cellule e ne impediscono la fagocitosi.

Produce due distinte emolisine: una fosfolipasi C, termolabile, e un ramnolipide, termostabile. L'attività emolitica è particolarmente evidente nei confronti degli eritrociti di coniglio e di montone. Su agar all'uovo la fosfatasi C determina la formazione di un alone opaco attorno alle colonie.

Elabora due pigmenti principali: la *piocianina* e la *pioverdina*. La prima in ambiente acido ha un colore variabile dal verde al giallo e quindi al rosso, mentre in ambiente alcalino è incolore. L'intensità della pigmentazione del mezzo spesso aumenta tenendo per 3-4 h a temperatura ambiente (18-22°C) le colture sviluppate a 37°C. La seconda detta anche *fluorescina*, conferisce al terreno una colorazione dal giallo al verdastro, è insolubile in cloroformio e solubile in acqua. In un esiguo numero di stipiti (dall'1 al 3%) è stata evidenziata la produzione di altri due pigmenti: la *piorubrina* e la *piomelanina*.

I fattori responsabili del potere patogeno non sono ancora esattamente definiti. È sicura la elaborazione di due esotossine: A ed S. La tossina A, un polipeptide di PM 66.000-72.000, inibisce *in vitro* e *in vivo* la sintesi delle proteine a livello ribosomiale. Allo stato in purezza si dimostra altamente tossica per il topino ed altri animali di laboratorio causando ipotensione e shock, necrosi epatica e leucopenia. La tossina S, una proteina di PM 49.000, è immunologicamente diversa dalla precedente e non è tossica per il topino. La produzione di queste tossine non è caratteristica costante della specie: per la A essa riguarda infatti circa il 90% degli stipiti e per la C non oltre il 40%.

Pseudomonas aeruginosa è dotata di scarsa resistenza. In particolare viene rapidamente distrutta dal calore (entro 1 ora a 55°C), dall'essiccamento, dai comuni disinfettanti. Manifesta attività patogena per cavia, coniglio e topino bianco per inoculazione endovenosa o endoperitoneale.

Si trova largamente diffusa in natura ove è presente soprattutto nelle acque, nel terreno, nei liquami, sulla cute e fa parte della normale flora microbica intestinale dell'uomo e degli animali.

La più comune porta d'ingresso del bacillo piociano è rappresentato dalla cute, ma la penetrazione nell'organismo può avvenire anche a livello del rinofaringe, delle vie respiratorie, dell'apparato digerente e genitale, della mammella.

Negli animali le forme morbose conseguenti all'infezione si traducono in fenomeni generalizzati di tipo setticemico oppure in processi infiammatori a prevalente carattere purulento, circoscritti a vari organi ed apparati: dermatiti, otiti, ulcere corneali, meningiti, broncopolmoniti, enteriti, mastiti, metriti, flogosi urinarie (pieliti e cistiti), ascessi splenici ed epatici, artriti e altro ancora. La malattia si manifesta in episodi sporadici, ma può assumere, in talune circostanze e in determinate specie,

carattere endemico. Ciò accade soprattutto nei volatili, in alcuni animali da pelliccia e nei bovini, limitatamente a quadri anatomoclinici a carico della mammella.

Nei volatili (polli, tacchini, fagiani, anatre) *P. aeruginosa* è stata a più riprese riconosciuta responsabile di mortalità embrionale e di forme acute in soggetti neonatali caratterizzate da abbattimento, incoordinazione dei movimenti, edema degli organi erettili (cresta, bargigli, caruncole), dei seni infraorbitali e delle articolazioni nonché da congiuntivite, diarrea e da elevata percentuale, di esiti letali in 24-48 ore.

In questi casi al tavolo anatomopatologico si rileva presenza di essudato nelle cavità articolari, di focolai necrotici in sede epatica, splenica, renale, encefalica, e altresì di lesioni che somigliano alla colisetticemia (aerosacculite, pericardite, periepatite). Il verificarsi di vere e proprie endemie è spesso conseguente alla inoculazione di soluzioni antibiotiche e di vaccini contaminati da *Pseudomonas*.

Negli animali da pelliccia, in particolare nel cincillà e nel visone, l'infezione assume di frequente carattere endemico e si traduce solitamente in gravi forme respiratorie (polmonite emorragica), che s'instaurano per inalazione dell'agente causale in seguito, si suppone, all'annusamento di alimenti inquinati e in altrettanto gravi forme enteriche (Farina *et al.*, 1998).

L'insediamento di *P. aeruginosa* nella mammella della bovina avviene di solito per via intracanicolare in seguito a infusione attraverso il capezzolo di preparazioni antibiotiche contaminate oppure tramite le tettarelle, impropriamente disinfettate, della mungitrice meccanica. Si tratta di una mastite purulenta acuta parenchimatosa, senza tendenza all'ascessualizzazione. L'insorgenza è per solito improvvisa e la reazione locale intensa; la secrezione si mostra profondamente alterata, contiene sangue o assume colore bruno-scuro e verde bluastrò. Lo stato generale appare sin dall'inizio seriamente compromesso (febbre elevata, depressione del sensorio, andatura incerta e barcollante, progressivo dimagrimento). Il quadro morboso si conclude sovente con la morte.

Meno frequentemente la mastite piocianica assume le caratteristiche di una flogosi catarrale. In tal caso la remissione dei sintomi locali è abbastanza rapida, anche se non di rado l'infezione può recidivare più volte nel corso della lattazione. In ogni modo non appare compromesso lo stato generale dell'animale e l'esito è benigno tanto *quoad vitam* che *quoad functionem* (Farina *et al.*, 1998).

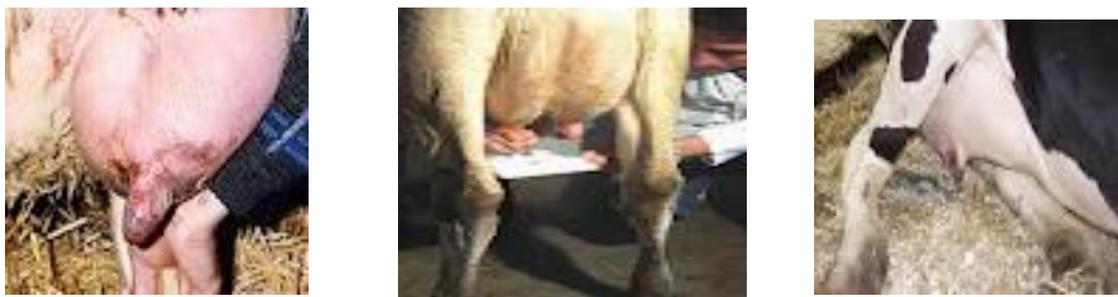


Fig 10 - Mastiti da *Pseudomonas spp.*

Il coinvolgimento di *P. aeruginosa* in varie situazioni patologiche può essere accertato soltanto per mezzo di esami batteriologici.

Eventuali interventi terapeutici debbono tener conto della resistenza che il germe manifesta o facilmente acquisisce nei confronti di diversi antibiotici e della efficacia che possiedono nei suoi riguardi soprattutto gli aminoglicosidi (gentamicina, cloramfenicolo, tetraciline). Buona norma rimane tuttavia quella di affidare, ove possibile, la giusta scelta all'effettuazione preliminare di antibiogrammi.

La prevenzione si basa sostanzialmente sull'identificazione ed eliminazione delle sorgenti d'infezione, sulla riduzione degli stress e sulla massima cura dell'igiene (ricoveri, mungitura, parto e puerperio, operazioni chirurgiche, incubazione e schiusa delle uova, tosatura, ecc.).

Una profilassi immunizzante a mezzo di vaccini è stata attuata in alcuni Paesi unicamente per limitare i danni della malattia in animali da pelliccia (Farina *et al.*, 1998).

Tab 7. *Pseudomonas aeruginosa* negli animali (Zavanella *et al.*, 2004).

| Specie | Azione patogena |
|------------------------|---|
| Bovini e ovini-caprini | Mastite purulenta acuta parenchimatosa, infezioni cutanee, uterine, enteriche, aborti |
| Suini | Epidermite essudativa, enterite, rinite atrofica, polmonite cronica, |

| | |
|---|--|
| | mastite, infezioni dell'apparato genito-urinario |
| Equini | Otiti, dermatiti, cistiti |
| Volatili (polli e tacchini) | Mortalità embrionale e neonatale nei pulcini con difficoltà di schiusa, scarso riassorbimento del sacco vitellino e quadri di onfalite |
| Animali da pelliccia (visoni e cincillà) | Polmoniti, enteriti |
| Cani e gatti | Processi infiammatori cutanei a carattere purulento, otorrea |
| Rettili | Ascessi, setticemie |



Fig 11 - Mastite da *Pseudomonas spp.*

2.4 *Pseudomonas* spp. e *Pseudomonas fluorescens* nell'igiene degli alimenti

L'importanza delle *Pseudomonadaceae* in microbiologia alimentare risiede principalmente nella loro capacità di alterare gli alimenti in qualità di organismi alterativi specifici (*specific spoilage organisms*), rendendoli inaccettabili per il consumo umano (Giaccone, 2010).

Il ruolo di organismi alterativi specifici è legato ai seguenti fatti:

- sono batteri molto diffusi nell'ambiente e potenziali contaminanti di qualsiasi alimento. Dalle sedi naturali (suolo, pulviscolo atmosferico e acque superficiali) i batteri possono trasferirsi sui prodotti ortofrutticoli, sugli animali di allevamento e i prodotti derivati (carni, uova, latte)
- possono svilupparsi bene alle temperature di refrigerazione con possibilità di diffondersi lungo la catena di produzione
- possono produrre enzimi proteolici termostabili e lipolitici, responsabili delle variazioni organolettiche dei prodotti alimentari anche trattati termicamente (gusto amaro, odore di ammoniacca, rammollimento). Sono state condotte delle prove sperimentali su proteasi estratte da *P. fluorescens*, da cui risulta che riscaldando a 121° per 2 minuti solo il 40% dell'attività enzimatica iniziale viene persa (Patel *et al.*, 1983)
- possono produrre pigmenti cromogeni che modificano il normale aspetto dell'alimento
- possono aderire saldamente alle superfici formando un biofilm difficile da eliminare e che può diventare una continua fonte di contaminazione secondaria degli alimenti
- molti ceppi presentano una certa resistenza ai comuni prodotti per la pulizia e disinfezione dei locali e delle attrezzature.

Per giornalisti e consumatori un simile difetto di colore dei formaggi è risultato impressionante e inquietante, viste anche le modalità con cui a volte si manifesta (le mozzarelle che virano di colore dal bianco al blu sotto gli occhi dei consumatori).

Per gli addetti ai lavori le mozzarelle blu, le ricotte rosse o la fosforescenza dei tramezzini sono tutte *alterazioni cromatiche* conosciute, che si osservano abbastanza spesso, soprattutto in estate.

Le alte temperature esterne e la difficoltà di mantenere costante la catena del freddo favoriscono lo sviluppo di microrganismi banali che si trovano comunemente negli alimenti, ma in basse cariche e senza che ciò costituisca un problema igienico-sanitario. Se, però, queste flore microbiche superano le 10^5 o 10^6 ufc/g, allora facilmente si sviluppano odori sgradevoli, l'alimento diventa amaro oppure si tinge di colori innaturali (Giaccone, 2010).



Fig 12 - Mozzarelle blu da *Pseudomonas fluorescens*.



Fig 13 - Latte blu da *Pseudomonas fluorescens*.

2.4.1 Fisiologia di *Pseudomonas*

Il genere *Pseudomonas* comprende batteri Gram negativi mobili, aerobi e psicrotrofi; non producono spore e non sono resistenti al calore, per cui non sopravvivono a trattamenti di pastorizzazione condotti oltre i 65°-70°C per tempi superiori ai 15-30 secondi. Sono microrganismi normodurici: non duplicano in alimenti con pH inferiore a 5,0 e già sotto pH 5,8 rallentano di molto la loro moltiplicazione. Negli alimenti tendenzialmente acidi, quindi, è difficile che le pseudomonadacee riescano a proliferare. I loro “punti di forza” sono tre:

- 1) sono psicrotrofi e riescono a moltiplicare (se pure lentamente) fino a 3°C
- 2) sintetizzano molti enzimi e possono metabolizzare sia composti di basso peso molecolare (amminoacidi, mono- e disaccaridi) sia molecole di grandi dimensioni, come proteine e acidi grassi, producendo vari composti chimici di basso peso molecolare che conferiscono agli alimenti odori e/o sapori più o meno sgradevoli
- 3) molte specie sintetizzano pigmenti idrosolubili che possono diffondere negli alimenti; questi pigmenti si chiamano **fluoresceina** (giallo dorato), **piorubina** (rosso-marrone), **piomelanina** (nero), **pioverdina** (verde) e **piocianina** (blu-viola)

Queste caratteristiche metaboliche fanno sì che *Pseudomonas* sia uno dei generi di maggiore interesse in campo alimentare perché quando riescono a moltiplicare in un alimento e a raggiungere cariche superiori a 10^5 o 10^6 ufc/g, alterano il prodotto conferendogli odori strani e/o colorazioni anomale (Giaccone, 2010).



Fig 14 - Latte blu da *Pseudomonas fluorescens*.



Fig 15 - Latte blu da *Pseudomonas fluorescens*.

2.4.2 Fonti d'inquinamento degli alimenti

Le *pseudomonadacee* sono ubiquitarie nell'ambiente: sono presenti nel terreno coltivato, nel pulviscolo atmosferico e nelle acque di scorrimento superficiale. Da questi siti di proliferazione naturale, possono trasferirsi facilmente su tutti i vegetali e difatti sono in assoluto uno dei componenti più numerosi della flora microbica di ortaggi e frutta, specialmente se a foglia verde come le insalate. La loro costante presenza nelle acque di scorrimento superficiali fa sì che *Pseudomonas* sia sovente presente anche nelle acque potabili "di lavoro", utilizzate nelle industrie alimentari, visto che sono in grado di resistere alla clorazione delle acque meglio dei batteri di origine fecali quali i coliformi e i principali patogeni.

Partendo sempre dall'ambiente, le pseudomonadacee si estendono agli animali in allevamento, soprattutto sul mantello, e ciò giustifica il loro passaggio a materie prime di origine animale quali le carni e il latte crudo. Il fatto poi che l'uomo porti quasi subito queste materie prime a temperatura di refrigerazione profonda, intorno a 0°-2°C, favorisce la selezione di *Pseudomonas* fra i vari componenti della microflora iniziale di qualunque alimento, e accentua la sua diffusione lungo la catena alimentare (Giaccone, 2010). Sovente il latte è sottoposto a intensi processi di pastorizzazione, prima di essere destinato alla produzione di formaggi e questo costituisce un ostacolo praticamente invalicabile per *Pseudomonas*, le cui cariche si possono ridurre di oltre 6-7 gradi logaritmici a seguito dei predetti trattamenti termici. Tuttavia, l'uso di acqua per risciacquare le superfici di lavoro durante la sanificazione e per raffreddare alimenti sottoposti a cottura fa sì che le pseudomonadacee siano sovente presenti sulle superfici di lavoro nelle industrie alimentari e questo giustifica il loro isolamento da prodotti lattiero-caseari fatti con latte pastorizzato, quali i formaggi freschi e quelli a pasta filata (Giaccone, 2010).



Fig 16 - Alterazioni cromatiche da *Pseudomonas fluorescens* in mozzarella.



Fig 17 - Mozzarella con puntinature rosa sostenute da *Pseudomonas fluorescens*.



Fig 18 - Ricotta rosa dovuta a *Pseudomonas fluorescens*.



Fig 19 - Mozzarella blu da *Pseudomonas fluorescens*.



Fig 20 – Formaggi freschi blu da *Pseudomonas fluorescens*.

2.4.3 *Pseudomonas* come causa di modificazioni di colore degli alimenti

Più l'igiene di produzione è elevata, minori sono le cariche di *Pseudomonas* che arrivano a inquinare gli alimenti pronti per essere messi in commercio; occasionalmente può capitare che le pseudomonadacee riescano a crescere in alimenti di origine animale o misti, provocando modificazioni delle loro caratteristiche sensoriali.

Sovente si tratta di modificazione dell'aroma e/o del sapore del prodotto, che può diventare amaro o assumere odori strani (“di sapone”, “di fruttato”, “di patata”, “di cherosene”). Altrettanti frequenti sono le alterazioni cromatiche dovute al fatto che il batterio, proliferando nella matrice alimentare, produce esso stesso un pigmento che conferisce all'alimento colori innaturali (giallo, rosso, verde fluorescente e blu-viola) (Giaccone, 2010).

Il tipo di pigmento che altera il prodotto può anche guidare nell'identificazione del batterio, ma la certezza della correlazione difetto/batterio si può avere solo isolando dall'alimento il germe e

procedendo alla sua identificazione biochimica, sierologica o genomica.

Il genere *Pseudomonas* conta moltissime specie tra le quale, a volte, le differenze sono talmente esili che alcuni autori sono portati a considerarle biovarianti di una sola specie. Per semplificare, possiamo dire che all'interno del genere si possono individuare due gruppi:

i ceppi produttori di pigmenti fluorescenti (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* e *P. putida*) e

i ceppi che non producono pigmenti fluorescenti (*P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes* e *P. pseudoalcaligenes*) (Giaccone, 2010).

P. aeruginosa è in grado di produrre almeno sei differenti pigmenti: **piocianina** (colore blu intenso), **piorubina** (rosso cupo), **clororafina** (verde fluorescente), **ossifenazina** (arancio carico), una “**proteine blu**” sua tipica non meglio identificata e la **pioverdina** (giallo-verdastro) (Giaccone, 2010).

L'altra specie tipicamente pigmentante è *P. fluorescens*, ma qui le cose si complicano perché all'interno di questa specie c'è una tale varietà di cloni fisiologicamente differenti che i tassonomi hanno individuato sinora 5 differenti gruppi, chiamati biovarianti o *biovar*:

Biovar I: cloni che hanno le caratteristiche tipiche di *P. fluorescens*

Biovar II: organismi saprofiti e ceppi di *P. marginalis*

Biovar III: comprende i ceppi fluorescenti in grado di degradare acidi carbossilici

Biovar IV: include ceppi di quella che un tempo era chiamata *P. lemonnieri* che producono un pigmento blu

Biovar V: gruppo di cloni molto eterogenei dal punto di vista delle proprietà nutrizionali e che hanno perso una o più caratteristiche ritenute essenziali per l'attribuzione a una dei precedenti biovar (Giaccone, 2010).

Nel 2000 Cantoni e collaboratori ebbero l'occasione di analizzare alcuni campioni di mozzarella che all'apertura si presentavano di un bel colore blu che poi virò al verde a distanza di 7-8 giorni di conservazione in frigorifero. Da tutti i campioni esaminati gli autori identificarono appunto il biovar IV di *P. fluorescens* che produceva un pigmento che poteva sfumare dal blu al verde fluorescente, secondo il substrato sul quale il batterio cresceva.

In una successiva ricerca del 2001 sempre Cantoni scoprì che esisteva una ulteriore biovariante di *P. fluorescens* in grado di produrre un pigmento idrosolubile fortemente blu che si stava diffondendo a quell'epoca nei caseifici che producevano mozzarelle ad acidificazione lattica e mista, mentre le mozzarelle ottenute per sola aggiunta di acido citrico sembravano al riparo da simili alterazioni (Giaccone, 2010).

2.4.4 *Pseudomonas* e salute umana

I batteri del genere *Pseudomonas* possono essere potenzialmente patogeni sia per i vegetali che per gli animali a sangue freddo e a sangue caldo. Nell'uomo, le pseudomonadacee possono causare infezioni di vari organi, ma quasi sempre sono infezioni opportunistiche che colpiscono soggetti con difese organiche compromesse. Ecco perché *Pseudomonas* diventa un pericoloso agente di infezioni solo all'interno degli ospedali. In effetti, le pseudomonadacee sono state più volte isolate dall'acqua potabile, dai fiori portati dai parenti per gli ammalati, nei lavandini e nei servizi igienici degli ospedali, nonché negli strofinacci usati per le pulizie e in vari strumenti medici che dovrebbero, in teoria, essere usati sempre sterili, quali deflussori per dialisi, sonde per attrezzature per dialisi, gorgogliatori dell'ossigeno, cateteri e nelle stesse soluzioni disinfettanti a base di ammonio quaternario che sovente si usano in ospedale.

La specie di maggiore interesse clinico è sicuramente *Pseudomonas aeruginosa*, ma in letteratura medica sono segnalati fatti settici sostenuti anche da altre specie di *Pseudomonas*. Nei pazienti colpiti da altre patologie che creano un calo delle difese immunitarie le pseudomonadacee, a partire da *P. aeruginosa*, possono provocare infezioni di organi e tessuti in pazienti colpiti da lesioni traumatiche, ustioni, o sottoposti a intervento chirurgico per impianti di protesi o anche solo interventi esplorativi. Anche i tossicodipendenti sono esposti a rischio di infezioni da *Pseudomonas*.

È importante precisare che *P. aeruginosa* diventa concretamente patogena solo quando riesce a penetrare all'interno dei tessuti umani superando la barriera di cute o mucose, come capita nel caso di un danno tissutale diretto (ustioni), per uso di cateteri urinari o endovenosi o a seguito di un calo delle difese immunitarie (terapie antineoplastiche, patologie croniche debilitanti) (Giaccone, 2010).

Se ricordiamo che in genere le pseudomonadacee:

(1) sono batteri poco esigenti come nutrienti

(2) facilmente diventano resistenti agli antibiotici e ai disinfettanti,

(3) formano facilmente dei biofilm sulle superfici di lavoro e che questi biofilm ne aumentano la resistenza alle condizioni ambientali avverse

comprendiamo facilmente come possano diventare dei temibili agenti di infezione proprio negli ospedali (Giaccone, 2010).

Per quanto riguarda gli alimenti nei quali si registri una crescita di *Pseudomonas*, si stima che la dose infettante minima sia di 10^6 ufc/g di alimento, ma quasi sempre per avere concreti rischi di tossinfezione alimentare bisogna che *P. aeruginosa* raggiunga nell'alimento cariche non inferiori a 10^7 ufc/g, valori francamente assai poco probabili perché comunque segnalati da evidenti modificazioni delle caratteristiche sensoriali.

Non tutti i cloni di *P. aeruginosa* sono in grado di sintetizzare i fattori di virulenza che la rendono infettante per l'uomo per cui non tutti i ceppi sono concretamente pericolosi per la salute umana. Si stima che i cloni veramente pericolosi per l'uomo (come infezioni ospedaliere) siano l'1-2% di tutti i ceppi di *P. aeruginosa* che conosciamo. Di conseguenza, il rischio per la salute umana è decisamente trascurabile per i soggetti normalmente immunocompetenti; può essere più elevato per i soggetti immunodepressi, come sono i pazienti ospedalizzati (Giaccone, 2010).

Alla luce dei dati reperibili in letteratura scientifica possiamo concludere che:

- (1) i batteri del genere *Pseudomonas* sovente inquinano gli alimenti, in fase di produzione e poi durante la loro vita commerciale
- (2) a essere inquinati sono soprattutto gli alimenti di origine vegetale o mista (come maionese e altri prodotti di gastronomia)
- (3) anche gli alimenti di origine animale sovente veicolano *Pseudomonas* sulla loro superficie o al loro interno, in particolare carni fresche e latte crudo
- (4) questi batteri non sono particolarmente resistenti alle condizioni ambientali avverse e non sono capaci di sopravvivere a trattamenti quali la pastorizzazione del latte o procedimenti analoghi che portino la temperatura dell'alimento a cuore oltre i 70°C per non meno di 30-60 secondi
- (5) le pseudomonadacee possono essere presenti su un'ampia varietà di alimenti; se trovano possibilità di crescita, possono conferire all'alimento caratteristiche sensoriali sgradevoli che lo

rendono non più idoneo al consumo umano

(6) un'attenta applicazione delle BPL in fase di lavorazione serve a tenere sempre sotto controllo le loro cariche, ma è inevitabile che questi batteri riescano a inquinare i prodotti, visto che sovente sono presenti sulle superfici di lavoro dove si trovano essendo veicolate dalle acque di lavoro

(7) la proliferazione di *Pseudomonas* è da temere soprattutto nei prodotti con valori di pH superiori a 5,8 e con A_w superiori a 0,940, sempre in presenza di ossigeno atmosferico (il confezionamento sotto vuoto inibisce quasi del tutto questi batteri, così come un confezionamento in MAP privo di ossigeno)

(8) in ogni caso, l'eventuale proliferazione di *Pseudomonas* in un alimento (compresa *P. aeruginosa*) può comportare l'alterazione delle caratteristiche sensoriali, ma è ben poco probabile che possa comportare problemi di salute umana, se si tratta di alimenti (Giaccone, 2010).

2.4.5 Prevenzione dei fattori di alterazione degli alimenti

Solamente l'attenta applicazione delle buone pratiche di lavorazione può aiutare gli operatori del settore alimentare a tenere sotto controllo i microrganismi contaminanti come le *Pseudomonadaceae* ed evitare perdite economiche dovute al ritiro dei prodotti alterati. Questo comporta il controllo delle materie prime anche dal punto di vista della loro qualità microbiologica, l'organizzazione della lavorazione secondo il principio "dal più sporco al più pulito", il controllo dei parametri misurabili di temperatura, pH, a_w , umidità relativa, il controllo dell'efficacia delle operazioni di pulizia e disinfezione e l'attenta formazione di tutti gli operatori in materia di igiene degli alimenti (Giaccone, 2010).

2.4.6 Contaminazioni microbiche degli alimenti.

Qualunque alimento sia esso trasformato o meno, che l'uomo utilizza per il proprio sostentamento contiene un numero di microorganismi più o meno abbondante a causa della presenza di questi nell'ambiente (aria, acqua, suolo) e in tutti gli esseri viventi, uomo incluso. Le specie microbiche presenti come contaminanti negli alimenti, così come l'entità della contaminazione, rivestono una grande importanza in quanto da una gran parte condizionano la velocità della comparsa dei fenomeni alterativi, e conseguentemente la vita conservativa del prodotto, e dall'altra, spesso, anche la sua sanità. La velocità, come pure l'intensità, della comparsa dei fenomeni alterativi non è un processo costante ed uguale per tutti gli alimenti ma varia notevolmente in funzione di un gran numero di fattori. In linea generale, tuttavia, si può affermare che la comparsa dei fenomeni alterativi è direttamente proporzionale al numero di microorganismi presenti ed alle loro caratteristiche metaboliche, ed inversamente proporzionale alle condizioni ambientali che ostacolano lo sviluppo microbico (Tiecco, 2000).

Poiché in genere l'attività metabolica dei microorganismi è un carattere che richiede particolari studi per essere evidenziato, possiamo dire, con le dovute riserve, che la velocità di comparsa dei fenomeni alterativi è direttamente proporzionale alla carica microbica (Tiecco, 2000).

Appare evidente, pertanto, l'importanza che riveste la quantità dei microorganismi presenti sugli alimenti al momento della loro produzione. Data la grande distribuzione dei microorganismi nell'ambiente possiamo affermare che la contaminazione dei nostri alimenti si verifica in ogni momento della loro produzione e che comunque viene influenzata dalle condizioni igieniche dell'ambiente in cui avviene la loro produzione e preparazione. Molti ricercatori suddividono le contaminazioni microbiche in funzione del momento in cui vengono a verificarsi. È un sistema di classificazione non esatto in quanto, come vedremo, molto spesso la stessa fonte di contaminazione interviene più volte nel corso della preparazione degli alimenti e di conseguenza non permette d'individuare, in funzione dei microorganismi presenti, il momento in cui la contaminazione stessa è avvenuta. Tuttavia, anche con questa limitazione, almeno dal punto di vista didattico, tale modo di suddividere i momenti della contaminazione degli alimenti merita di essere eseguito. Le contaminazioni degli alimenti possono pertanto essere così suddivise:

a) contaminazioni primarie: sono quelle contaminazioni che si verificano negli alimenti in fase di produzione (materie prime) ad opera dell'acqua, aria, suolo e dell'animale produttore stesso;

b) contaminazioni secondarie: sono quelle che si verificano in fase di lavorazione e dipendono

pertanto prevalentemente dall'ambiente di lavoro come pure dal personale che manipola le derrate in lavorazione;

c) contaminazioni terziarie: sono quelle che si verificano a livello della conservazione, stoccaggio e commercializzazione del prodotto;

d) contaminazioni quaternarie: sono quelle che si verificano in fase di consumo degli alimenti e sono particolarmente importanti nella ristorazione collettiva.

Un altro tipo di contaminazione che merita di essere ricordato, è la cosiddetta “*contaminazione crociata*”; s'intende con questo termine il passaggio di microorganismi da una sostanza ad un'altra per contatto tra di esse. Molte sono le fonti di contaminazione che incidono in maniera più o meno massiccia sulla microbiologia dei nostri alimenti. In linea generale queste fonti di contaminazione possono essere così classificate:

- ambiente;
- animale;
- uomo.

Contaminazioni primarie

Questo tipo di contaminazione avviene ad opera dell'acqua, dell'aria, del suolo e, trattandosi di alimenti di origine animale, dell'animale produttore stesso (Tiecco, 2000).

Contaminazioni da parte di microorganismi presenti nell'acqua

La qualità microbiologica dell'acqua riveste grande importanza nella contaminazione degli alimenti poiché l'acqua trova vasto impiego nell'industria alimentare venendo utilizzata non solo per il lavaggio e risciacquo delle attrezzature, delle utensilerie, dei tavoli da lavoro, ecc... per uso personale da parte delle maestranze ed in particolare per il lavaggio delle mani, ma anche per il lavaggio di certi ingredienti, come per esempio i vegetali, ed è quindi destinata a venire in contatto diretto con gli alimenti. In alcuni casi, essa può considerarsi un vero e proprio coadiuvante tecnologico o addirittura un ingrediente del prodotto alimentare finito. Va ricordato che anche la qualità chimica dell'acqua riveste una grande importanza per l'industria alimentare; non tutte le acque sono necessariamente idonee per tutte le industrie e per tutti gli scopi. così per esempio:

- un'acqua contenente tracce di ferro può non essere adatta nell'industria che produce bevande;
- un'acqua troppo ricca di calcio può influenzare la tessitura di certi prodotti;
- un'acqua dura rende meno attivi i detersivi per cui influenza negativamente i sistemi di pulizia nelle aziende;
- un'acqua dolce rende più attivi i detersivi, previene la formazione di incrostazioni ma può risultare corrosiva.

La durezza dell'acqua esprime il quantitativo di bicarbonati di sodio e magnesio, di solfati di calcio e magnesio e di altri sali in essa presenti. La durezza può essere distinta in:

- *temporanea*: è dovuta alla presenza di bicarbonati e può essere ridotta mediante bollitura (i bicarbonati si trasformano in carbonati che precipitano);
- *permanente*: è dovuta alla presenza di solfati e non è eliminabile con la bollitura.

Tab 8. Classificazione geologica della durezza dell'acqua (Tiecco, 2000).

| Durezza | Ioni Calcio + Magnesio espressi come ppm di Carbonato di Calcio |
|--------------------|---|
| Dolce | 0-60 |
| Moderatamente dura | 60-120 |
| Dura | 120-180 |
| Molto dura | > 180 |

È chiaro, pertanto, come la qualità microbiologica possa influire in maniera determinante sulla qualità igienica degli alimenti (Tiecco, 2000).

Va sempre tenuto presente che l'acqua non è mai sterile, ma risulta sempre più o meno contaminata da microorganismi appartenenti a generi diversi provenienti dal suolo (*Streptomyces*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*; *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*,

Chromobacterium, *Moraxella*, *Xantomonas*, *Flavobacterium*), da materiale fecale proveniente dall'uomo e dagli animali (Enterobacteriaceae, *Enterococcus*, ecc...). Inoltre, sono presenti germi autotrofi il cui sviluppo abnorme può determinare la comparsa di veri e propri fenomeni alterativi del prodotto od inconvenienti a livello delle tubazioni (ferrobatteri, sulfobatteri). In particolari circostanze, possono essere presenti anche specie microbiche patogene (*Salmonella*, *Shigella*, *E.coli enteropatogeni*, *V. cholerae*, ecc...) provenienti da contaminazioni fecali. Nell'acqua sono presenti anche delle muffe (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Botrytis*, *Fusarium*, ecc...) mentre solo raramente si rinvenivano lieviti. L'acqua rappresenta la principale via di disseminazione dei microorganismi di origine fecale. Come sopra ricordato, occasionalmente nell'acqua sono presenti germi patogeni rappresentati principalmente da microorganismi intestinali provenienti dall'uomo e dagli animali.

Nel passato, ma purtroppo ancora oggi, l'acqua è stata causa di malattie, a volte addirittura a carattere epidemico, nell'uomo proprio come conseguenza di contaminazioni fecali. Per evitare il ripetersi di tali incidenti, le acque vengono sottoposte a ripetuti controlli

batteriologici caratterizzati dalla ricerca dei cosiddetti germi "indice della contaminazione fecale". Questi germi sono rappresentati dai coliformi fecali (meglio ancora *E. coli*), enterococchi e *Clostridium perfringens* i quali appunto sono ospiti abituali dell'intestino umano ad animale. Poiché nelle feci degli animali predominano gli enterococchi mentre in quelle umane predominano i coliformi, è stata avanzata l'ipotesi che il rapporto coliformi fecali/enterococchi può essere utilizzato per stabilire se la contaminazione dell'acqua è di origine umana od animale. Se tale rapporto è > 1 la contaminazione è di origine umana, se invece è < 1 è di origine animale (Tiecco, 2000).

Va precisato, tuttavia, che tale rapporto ha valore solamente nel caso in cui la contaminazione è in atto dato che la sopravvivenza di questi due gruppi di microorganismi nell'ambiente idrico è notevolmente diversa; i coliformi fecali sono destinati a scomparire più precocemente degli enterococchi non appena la contaminazione viene a cessare.

L'approvvigionamento idrico nell'industria alimentare deve essere garantito con acqua batteriologicamente pura; tale approvvigionamento deve essere garantito o dalla rete urbana (acqua potabile) o da acqua di pozzo la quale, tuttavia, deve possedere tutti i requisiti chimici e batteriologici dell'acqua potabile ed essere regolarmente controllata nel tempo per assicurarsi che tali caratteri non vengano perduti. Nel caso di utilizzazione di acqua di pozzo si dovrà procedere alla clorazione assicurando che l'azione del cloro non sia inferiore ai 20-30' e che la sua

concentrazione non superi le 4 ppm (Tiecco, 2000).

La potabilità delle acque rientra tra le competenze dei presidi multizonali delle ASL ed è pertanto estranea ai compiti dei servizi veterinari, sebbene sia opportuno che questi conoscano gli esiti delle analisi dato che l'acqua viene a contatto con gli alimenti della cui igiene il veterinario è responsabile (Tiecco, 2000).

In alcuni casi, per ragioni contingenti, l'acqua potabile deve essere conservata in appositi serbatoi, ed utilizzata quindi in tempi successivi. La costruzione di questi serbatoi deve rispondere a requisiti prestabiliti ed in particolare: uso di materiali che non permettono il passaggio in soluzione di composti pericolosi; chiusura ermetica in modo da evitare la contaminazione dell'acqua da parte di uccelli ed altri animali infestanti e di polvere; facile esplorabilità in modo che sia possibile provvedere alla loro pulizia (Tiecco, 2000).

Come già detto, anche l'acqua potabile non è sterile per cui può verificarsi che certe specie microbiche possano riprodursi, eventualità questa molto frequente quando l'acqua rimane statica nei periodi festivi. La proliferazione microbica in questi serbatoi può risultare pericolosa non solo per gli alimenti con cui verrà in contatto ma pure per il sistema di distribuzione stesso. Per questa ragione, l'acqua conservata nei serbatoi deve essere sottoposta a frequenti controlli batteriologici.

L'impiego d'acqua non potabile nell'industria alimentare deve sempre essere considerato come fonte di potenziale pericolo; pur tuttavia acqua non potabile può essere introdotta negli stabilimenti per la produzione di alimenti a condizione però che:

- non venga introdotta nelle zone dove si manipolano prodotti alimentari;
- non venga utilizzata per le operazioni di sanificazione.

L'uso di quest'acqua, pertanto, deve essere limitato alla produzione di vapore, a scopi antincendio, ecc...

Per ragioni particolari, quali per esempio scarsa disponibilità di acqua in certe zone, può essere necessario il riutilizzo dell'acqua potabile previa ripotabilizzazione; tuttavia, fatto salvo il rispetto di certi requisiti quali l'assenza di microorganismi di significato sanitario e di sostanze chimiche a livelli tossici, tale acqua deve essere *considerata non potabile* e pertanto destinata esclusivamente per gli usi previsti per l'acqua non potabile.

Lo stato batteriologico dell'acqua va controllato con una certa frequenza in quanto, anche se fortunatamente abbastanza raramente, possono verificarsi, per cause varie, degli inquinamenti della rete idrica con gravi ripercussioni anche a livello industriale. Non vanno, infatti, dimenticati episodi di tossinfezione alimentare per contaminazione dei prodotti con acqua potabile inquinata.

I livelli di contaminazione di una buona acqua devono essere di non più di 10 ufc/ml; comunque va

ricordato che per le acque potabili esistono parametri chimici e batteriologici stabiliti da leggi particolari (DPR 236/88).

In molte industrie alimentari, proprio per ridurre questa contaminazione naturale, le acque destinate a venire in contatto con gli alimenti vengono sottoposte a trattamenti particolari quali:

- irraggiamento con raggi ultravioletti;
- filtrazione con particolari filtri al carbone;
- trattamenti termici;
- bonifica chimica; per lo più clorazione, anche se in questo caso va tenuta presente la possibilità di formazione di residui.

Va infine ricordato che se è vero che l'acqua rappresenta una fonte di contaminazione, è pure vero che ogni qual volta si procede al lavaggio di un prodotto si nota sempre una riduzione delle cariche microbiche in seguito all'azione meccanica esercitata dalla stessa. Pur tuttavia un certo numero di microorganismi presenti nell'acqua, prevalentemente psicrofili, aderiranno alle superfici trattate.

L'utilizzazione di acqua in una industria alimentare è considerevolmente elevata e di conseguenza le acque reflue son sempre abbondanti. Queste acque reflue hanno diversa provenienza e possono essere distinte in:

- acque utilizzate a scopo personale (lavabi, toilettes, ecc...)
- acque utilizzate nell'impianto di produzione.

Questi due tipi di acque devono essere convogliati in linee fognanti separate e comunque prima della loro eliminazione all'esterno sottoposti a depurazione. Si ricorda che le une e le altre possono contenere microorganismi patogeni e pertanto è sempre bene evitare la contaminazione ambientale (Tiecco, 2000).

Contaminazioni da parte di microorganismi presenti nell'aria.

Nell'aria sono sempre presenti microorganismi ed il loro numero è direttamente proporzionale alla quantità del pulviscolo in essa sospeso. Le particelle di polvere presenti nell'aria non filtrata possono raggiungere valori intorno a 10^8 particelle/m³. Si tratta di batteri, muffe e, più raramente, lieviti. Tra i batteri predominano gli sporigeni, i micrococchi e gli pseudomonadi mentre tra le

muffe *Aspegillus*, *Penicillium*, ecc..., e tra i lieviti *Torulopsis*. Raramente sono presenti nell'aria specie patogene. L'importanza del pulviscolo sullo stato microbico dell'aria viene ampiamente dimostrata quando prendiamo in esame la qualità igienica del latte al momento della mungitura, di cui parleremo in seguito. L'umidità dell'aria ne influenza la microbiologia, così nell'aria umida è favorito lo sviluppo di certe specie di muffe (*Asp. Rupens*) mentre in quella secca di altre (*Pen. Cyclopicum*) (Tiecco, 2000).

Per ridurre la contaminazione degli alimenti ad opera dell'aria è, pertanto, indispensabile in primo luogo evitare correnti o movimenti troppo violenti nei locali dove vengono prodotti o manipolati alimenti e soprattutto l'introduzione dall'esterno dello stabilimento di aria ricca di pulviscolo. Poiché, come abbiamo visto, l'aria veicola microorganismi in quantità variabile a seconda delle condizioni atmosferiche e di altri fattori, appare evidente che all'interno di uno stabilimento di produzione di alimenti il flusso d'aria debba procedere sempre dalle zone pulite verso quelle sporche. Grave sarebbe il danno per la produzione se si dovesse verificare il contrario. Il risanamento batteriologico dell'aria non è facile da raggiungere; tuttavia, oggi, almeno nei grandi stabilimenti di produzione e lavorazione degli alimenti, questa finalità viene raggiunta grazie alla climatizzazione delle sale di lavorazione che prevede appunto una filtrazione dell'aria prima della sua immissione nei locali (Tiecco, 2000).

Risultati ancora migliori si ottengono quando questa filtrazione viene preceduta da una prefiltrazione, che si rende indispensabile per l'approvvigionamento dell'aria nei locali dove vengono lavorati prodotti ad alto rischio ed in particolare nel confezionamento asettico (Tiecco, 2000).

2.5 Flora microbica intestinale dei bovini con particolare riferimento alle lattifere

2.5.1 Flora microbica intestinale dei bovini con particolare riferimento alle lattifere

Studi batteriologici del tratto intestinale dei ruminanti, nei vari anni di ricerca sono stati limitati principalmente agli studi microbiologici del rumine. A oggi, infatti, sono pochissimi i report pubblicati che riguardano l'isolamento della normale flora microbica intestinale dei bovini.

Uno studio condotto nel 1956 eseguito a Laramie, nel Wyoming, negli USA, è stato finalizzato all'analisi della flora batterica fecale di 37 bovini, che per la precisione, erano vacche lattifere e manzi, alimentati con razioni a base di foraggio grezzo di prati (erba medica e fieno polifita), eseguita su campioni fecali duodenali, ileali, cecali e colici (Maki *et al.*, 1965).

Sakazaki, Namioka, e Miura (1956) hanno affermato che *Escherichia coli* potrebbe essere trovato in quasi il 100% dei campioni fecali esaminati.

Nello studio delle feci di un bovino sano, Wilssens e Buttiaux (1958) hanno riscontrato che *E. coli*, *Streptococcus faecium*, *S. bovis*, micrococchi, e *Bacillus spp.* sono presenti molto frequentemente nei campioni esaminati.

In aggiunta, hanno scoperto che *Clostridium butyricum* è abbondante nelle feci degli animali durante l'inverno, e che la sua presenza è attribuita all'alimentazione a base d'insilati. *Clostridium perfringens* non è stato isolato da nessuno dei 37 animali esaminati.

Studi di streptococchi nel contenuto intestinale di bovini sono stati effettuati da Ayers e Mudge (1923), sui coliformi, da Carpenter e Woods (1924) e de Smith e Crabb (1956); su *C. welchii*, Taylor e Gordon (1940); lieviti, van Uden e Sousa (1957) e van Uden (1960). La loro presenza è stata notata abbinare, ma non si sono dedicati ad un'analisi del loro numero.

Sarebbe vantaggioso conoscere il numero dei batteri della normale flora intestinale dei ruminanti nelle indagini di malattie ad eziologia sconosciuta, in cui, un cambiamento del numero e della specie di batteri intestinali, possono essere presi in considerazione come possibile causa. Inoltre, una migliore comprensione dello stato di salute dei ruminanti, e delle loro produzioni, sia in termini di latte, che di carne, potrebbe essere ottenuta, studiando l'effetto della razione sulle tipologie, i numeri, e la distribuzione dei batteri nel tratto intestinale.

Questo studio è stato limitato alla ricerca di batteri intestinali coltivati in aerobiosi ed anaerobiosi dal tratto intestinale di vacche e manzi alimentati con razioni ad alta concentrazione di foraggio grezzo (fieno di erba medica e fieno polifita), ma non ad un'analisi quantitativa delle varie specie batteriche (Maki *et al.*, 1965).

Tab 9. Conta colturale di microorganismi isolati da contenuti intestinali ottenuto da 15 bovini alimentati con una razione a base di foraggio grezzo.

| Specie | 6 Campioni duodenali 1) n° d'isolati 2)n°di campioni positivi 3)conta per Gram in campioni positivi | 14 Campioni ileali 1) n° d'isolati 2)n°di campioni positivi 3)conta per Gram in campioni positivi | 7 Campioni cecali 1) n° d'isolati 2)n°di campioni positivi 3)conta per Gram in campioni positivi | 6 Campioni colici 1) n° d'isolati 2)n°di campioni positivi 3)conta per Gram in campioni positivi |
|----------------------------|--|--|---|---|
| <i>Escherichia coli</i> | 10 4 3*10 ⁵ | 52 8 1*10 ⁷ | 27 5 3*10 ⁵ | 9 3 6*10 ⁵ |
| <i>E. citrobacter</i> | 0 0 - | 0 0 - | 5 1 1*10 ⁴ | 1 1 1*10 ⁴ |
| <i>Streptococcus bovis</i> | 16 4 6*10 ³ | 36 7 3*10 ⁵ | 7 4 4*10 ⁴ | 8 4 3*10 ⁵ |
| <i>S. faecalis</i> | 1 1 1*10 ³ | 2 2 6*10 ³ | 1 1 1*10 ³ | 5 1 1*10 ⁴ |
| <i>S. faecium</i> | 0 0 - | 1 1 1*10 ⁷ | 0 0 - | 0 0 - |
| <i>Streptococcus sp.</i> | 0 0 - | 2 6 6*10 ³ | 0 0 - | 0 0 - |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 5 1 4*10 ⁵ | 21 4 3*10 ⁵ | 7 1 1*10 ⁵ | 7 2 1*10 ⁵ |
| <i>B. pumilus</i> | 8 1 2*10 ⁶ | 11 4 4*10 ⁵ | 19 1 1*10 ⁷ | 10 1 1*10 ⁶ |
| <i>B. circulans</i> | 0 0 - | 3 2 6*10 ⁵ | 1 1 1*10 ⁵ | 0 0 - |
| <i>B. cereus</i> | 0 0 - | 2 1 1*10 ⁴ | 1 1 1*10 ⁴ | 1 1 1*10 ³ |
| <i>B. pulvifaciens</i> | 0 0 - | 5 2 5*10 ⁵ | 0 0 - | 0 0 - |
| <i>Bacillus sp.</i> | 8 3 1*10 ⁷ | 10 4 3*10 ⁶ | 6 1 6*10 ⁴ | 0 0 - |
| <i>Micrococcus sp.</i> | 4 2 1*10 ⁶ | 5 3 3*10 ⁶ | 1 1 1*10 ⁷ | 0 0 - |
| <i>Staphylococcus sp.</i> | 1 1 1*10 ⁵ | 3 1 1*10 ⁶ | 0 0 - | 0 0 - |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|----|---|-------------------|----|---|-------------------|---|---|-------------------|----|---|-------------------|
| <i>Lactobacillus bifidus</i> | 17 | 2 | 6*10 ⁵ | 45 | 4 | 9*10 ⁷ | 0 | 0 | - | 0 | 0 | - |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 0 | 0 | - | 2 | 2 | 5*10 ³ | 0 | 0 | - | 0 | 0 | - |
| <i>Clostridium butyricum</i> | 0 | 0 | - | 0 | 0 | - | 0 | 0 | - | 4 | 1 | 4*10 ⁵ |
| <i>Clostridium sp.</i> | 0 | 0 | - | 2 | 2 | 1*10 ⁵ | 1 | 1 | 1*10 ⁵ | 1 | 1 | 1*10 ⁵ |
| <i>Brevibacterium lipolyticum</i> | 0 | 0 | - | 2 | 1 | 1*10 ⁴ | 0 | 0 | - | 1 | 1 | 1*10 ³ |
| <i>B. linens</i> | 0 | 0 | - | 1 | 1 | 1*10 ⁶ | 1 | 1 | 1*10 ⁵ | 0 | 0 | - |
| <i>B. sulfureum</i> | 0 | 0 | - | 1 | 1 | 1*10 ⁴ | 0 | 0 | - | 0 | 0 | - |
| <i>Arthrobacter citreus</i> | 1 | 1 | 1*10 ⁴ | 1 | 1 | 1*10 ⁶ | 0 | 0 | - | 0 | 0 | - |
| <i>Sphaerophorus sp.</i> | 0 | 0 | - | 1 | 1 | 1*10 ⁴ | 0 | 0 | - | 2 | 1 | 2*10 ⁶ |
| <i>Pseudomonas synxantha</i> | 0 | 0 | - | 2 | 1 | 1*10 ⁶ | 0 | 0 | - | 0 | 0 | - |
| <i>Streptomyces sp.</i> | 11 | 1 | 1*10 ⁵ | 6 | 2 | 6*10 ⁶ | 0 | 0 | - | 1 | 1 | 1*10 ⁵ |
| <i>Candida krusei</i> | 0 | 0 | - | 0 | 0 | - | 0 | 0 | - | 2 | 1 | 5*10 ³ |
| <i>Torulopsis famata</i> | 0 | 0 | - | 2 | 1 | 1*10 ⁴ | 0 | 0 | - | 0 | 0 | - |
| <i>Mucor sp.</i> | 19 | 4 | 5*10 ⁶ | 30 | 6 | 2*10 ⁶ | 5 | 2 | 5*10 ⁵ | 13 | 2 | 5*10 ⁶ |
| <i>Gram positivi bastoncellari, curvati, filamentosi, catalasi-positivi</i> | 0 | 0 | - | 3 | 3 | 1*10 ⁵ | 1 | 1 | 2*10 ⁴ | 3 | 1 | 1*10 ⁴ |
| <i>Gram positivi, cocchi</i> | 0 | 0 | - | 7 | 2 | 3*10 ⁴ | 4 | 2 | 1*10 ⁵ | 0 | 0 | - |
| <i>Gram positivi, bastoncellari, curvati,</i> | 2 | 1 | 2*10 ⁵ | 2 | 2 | 5*10 ⁴ | 0 | 0 | - | 0 | 0 | - |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>catalasi-negativi</i> | | | | | | | | | | | | |
| <i>Gram positivi, pleomorfi, aerobi, catalaso - positivi</i> | 5 | 1 | 4*10 ⁷ | 0 | 0 | - | 0 | 0 | - | 0 | 0 | - |
| <i>Gram positivi bastoncellari, pleomorfi, ramificati, anaerobi catalaso - positivi</i> | 1 | 1 | 1*10 ⁵ | 0 | 0 | - | 0 | 0 | - | 0 | 0 | - |

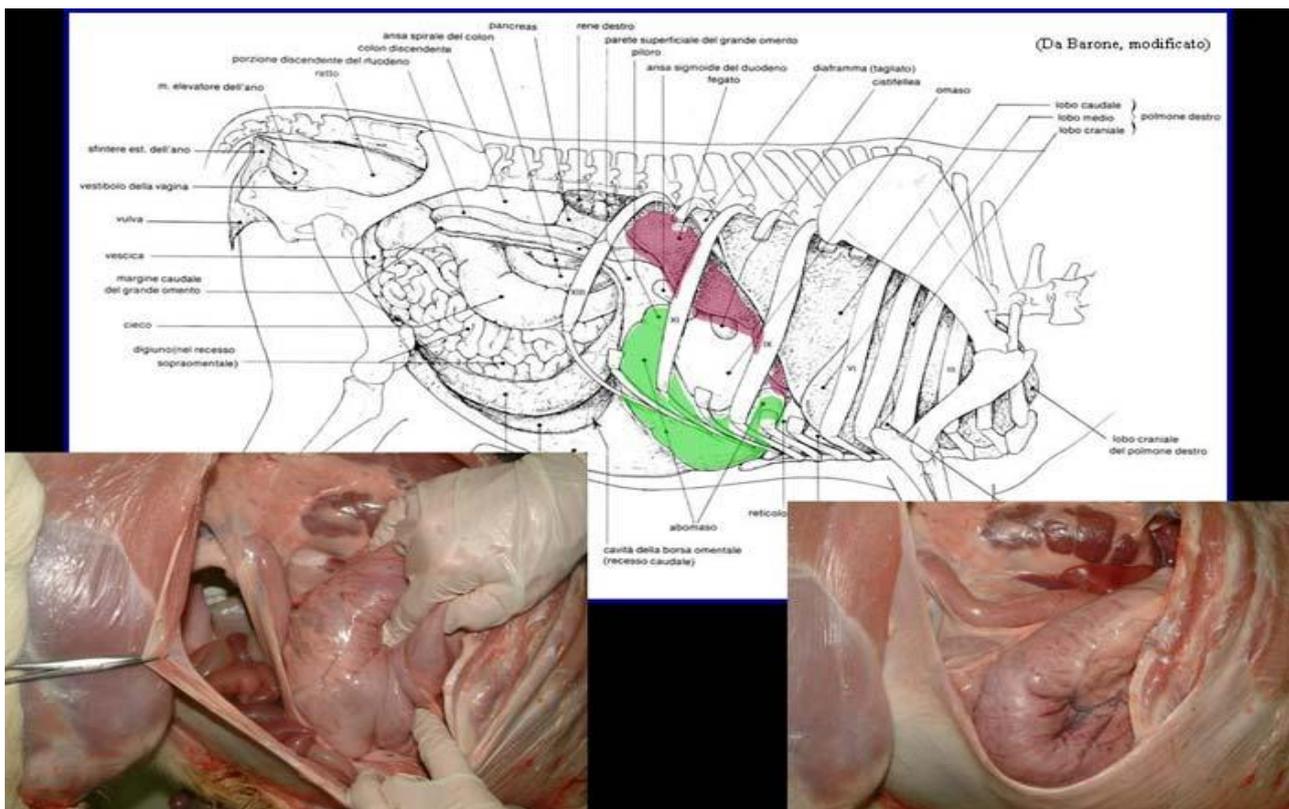


Fig.21 - Immagine anatomica dell'apparato digerente del bovino (www.2.vet.unibo.it).

2.5.2 Flora microbica del rumine

Il sistema ruminale

Il rumine è un ambiente anaerobio perennemente abitato da una ricca microflora, formata da batteri, protozoi e miceti.

Le popolazioni cellulari ruminali svolgono molteplici attività metaboliche in ragione delle proprie caratteristiche cellulari.

Ogni specie è autonoma in quanto esprime funzioni che dipendono dal suo corredo genetico e dalle caratteristiche della propria macchina biochimica.

Essa tuttavia risente, istante per istante, degli effetti esercitati dalle altre specie presenti sulla composizione del rumine. Ne risulta uno a partire da azoto inorganico e/o ammoniaca e da catene carboniose provenienti dal metabolismo da altre classi di composti organici. Fra questi aminoacidi, ovviamente, si trovano anche gli aminoacidi cosiddetti essenziali, ovvero quegli aminoacidi che sono costituenti indispensabili delle proteine, ma che gli organismi superiori non sono in grado di sintetizzare *ex novo*. Questa proprietà del rumine consente ai ruminanti di compensare gli eventuali difetti, in termini assoluti o relativi, dell'apporto di aminoacidi da parte delle specie vegetali, nelle quali tali sostanze sono rappresentate in modo non appropriatamente bilanciato per la necessità di un organismo animale. Analogo discorso si può fare per altri nutrienti essenziali, quali le vitamine. I microorganismi ruminali, possiedono gli enzimi necessari per la sintesi di tutte le vitamine, molecole che, una volta assorbite e modificate all'interno delle cellule dell'animale ospite, svolgono l'indispensabile funzione di cofattori di molte attività enzimatiche o quella di antiossidanti (vitamina E) o di fattori favorevoli la mineralizzazione dell'osso (vitamina D). Infine il rumine svolge una notevole attività detossificante nei confronti di sostanze xenobiotiche che sono presenti nell'ambiente ed ai cui effetti tossici, di conseguenza, è esposto l'organismo del ruminante, e con esso, potenzialmente, tutte le altre specie predatorie, incluso l'uomo, che della sorprendente capacità metabolica dei ruminanti si servono per la propria sopravvivenza (Mariani *et al.*, 1996).

Colonizzazione del rumine

I giovani ruminanti ricevono la microflora e la microfauna ruminali durante i primi giorni di vita, quando la madre li lambisce e quando essi stessi lambiscono la saliva della madre, unita al colostro,

unita al liquido ruminale rigurgitato durante la ruminazione. Microflora e microfauna presenti nel primo giorno di vita dell'animale giocano un ruolo importante nel condizionare il biotipo della popolazione cellulare ruminale dell'animale adulto.

Nella fase iniziale della vita, dunque, gli animali ricevono i microorganismi presenti nel rumine materno, ovvero specie unicellulari che sono caratteristiche del rumine (che vivono esclusivamente in esso) e strettamente anaerobie.

La popolazione cellulare ruminale si completa quando il giovane animale inghiotte foraggio parzialmente masticato da un animale adulto.

Data l'origine ambientale dell'alimento, esso costituisce anche una fonte di microorganismi aerobi ed anaerobi facoltativi. Questi microorganismi se dotati di un metabolismo compatibile con quello ruminale, resteranno vitali all'interno di esso, andando a completare la popolazione cellulare. Essi, comunque, rimangono ospiti minori e transitori del sistema, per effetto della semplice competizione con altri microorganismi più adatti all'ambiente ruminale. In generale, sia i batteri aerobi che gli anaerobi facoltativi e gli sporigeni sono meno rappresentati nell'animale adulto che nel giovane.

Negli animali adulti il numero e la composizione di cellule nel rumine variano in dipendenza della stagione, del luogo geografico, del contatto con altri animali e del metodo e del tipo d'alimentazione a cui viene assoggettato l'animale (Mariani *et al.*, 1996).

I batteri del rumine.

I batteri, compresi tra $8 \cdot 10^9$ e $4 \cdot 10^{10}$ cellule/ml di succo ruminale dell'adulto, si trovano liberi nella fase liquida ruminale, adesi alle particelle del digesto ed alla parete del rumine (flora epimurale) o a protozoi. Sono il tipo cellulare più rappresentato e, di conseguenza, i principali effettori e dei processi di degradazione dei polimeri vegetali ad oligosaccaridi e monosaccaridi, e delle reazioni fermentative. Essi sono, inoltre, i responsabili della produzione ruminale degli acidi grassi volatili, che rappresentano il principale prodotto di assorbimento di catene carboniose nelle cavità prestomacali dell'animale ospite, e gli effettori della sintesi *ex novo* di vitamine e aminoacidi essenziali. Infine, svolgono un ruolo determinante nella produzione ruminale di metano e nei processi di detossificazione da sostanze xenobiotiche. La densità della popolazione batterica nel rumine varia continuamente in ragione di vari fattori. La disponibilità nella razione di zuccheri rapidamente fermentescibili, ovvero di monosaccaridi (melassa) od oligosaccaridi (concentrati), porta ad una rapida crescita di batteri con attività metabolica fermentativa particolarmente efficiente.

Fra questi, in particolare i lattobacilli. Razioni contenenti polisaccaridi complessi (ad esempi,

cereali e foraggi) stimolano, invece, la crescita di batteri dotati di elevato potere degradativo dei polisaccaridi a saccaridi più semplici. A questa segue (ed in qualche misura si accompagna) anche lo sviluppo di batteri fermentanti. Ad esempio, in reazioni ricche di cereali *Streptococcus bovis* (specie amilolitica) è dominante, ed il prodotto fermentativo più elevato è il lattato. Il tipo di specie cellulari predominanti in ogni istante dipenderà essenzialmente da fenomeni di competizione per il substrato. Fra tutti i microorganismi che limitano la crescita batterica e controllano l'equilibrio regnante fra diverse specie batteriche questa si situa probabilmente al primo posto come fattore limitante. Ma il predominio di una specie sulle altre dipenderà anche dalla disponibilità di azoto e altri nutrienti essenziali, quali i minerali, e dai valori de pH ruminale.

Un'intensa fermentazione, che porta alla formazione di acidi con una velocità superiore a quella con la quale essi vengono allontanati attraverso l'assorbimento ed il metabolismo animale, o neutralizzati con l'immissione di tamponi nel sistema, determina una riduzione del pH, con regressione di numerose specie che giungono a scomparire e sviluppo di altre, quali *Megasphaera elsdenii* (Podestà *et al.*, 1996).

Una vivace crescita batterica comporta un aumento del numero di protozoi ruminali che, svolgendo un'attività predatoria sulla popolazione batterica, concorrono a controllare la densità. Parallelamente, la tendenza del pH ruminale a ridursi per effetto della disponibilità di glucidi fermentescibili è moderata dalla presenza dei ciliati (specialmente del genere *Entodinia*), che ingolfando ed utilizzando in sede intracellulare i granuli di amido, sottraggono il polisaccaride all'attacco degradativo e fermentativo dei batteri, prevenendo un accumulo di lattato e la conseguente acidosi intraruminale (Podestà *et al.*, 1996) .

Come già ricordato, nel rumine è presente una popolazione batterica che vive attaccata alla superficie dei protozoi, in particolare dei ciliati entodinomorfi. Il numero di batteri che si fissa su ogni ciliato dipende dalle dimensioni di quest'ultimo, con una media di 250 batteri per protozoo. Fra le specie batteriche che esprimono questa proprietà si annoverano *Streptococcus bovis*, *Ruminococcus albus* e batteri caratterizzati dalla capacità di sintetizzare metano a partire da anidride carbonica e idrogeno (batteri metanogeni). I batteri metanogeni instaurano con i protozoi un rapporto di simbiosi commensalistica, fornendo ad essi il glucosio derivante dalla degradazione della cellulosa e usufruendo dell'idrogeno prodotto da queste cellule eucariote mediante gli idrogenosomi, organuli specializzati ove avviene la conversione enzimatica del piruvato ad acetato, idrogeno ed anidride carbonica.

L'idrogeno viene utilizzato insieme all'anidride carbonica per eliminare gli equivalenti riducenti che si sono prodotti durante i processi catabolici ossidativi dei batteri, consentendo così a questi microorganismi di proseguire le proprie attività metaboliche (Podestà *et al.*, 1996).

È possibile classificare i batteri ruminali in base alla loro attività metabolica principale ed al

substrato energetico ad essi maggiormente utilizzato:

– **Cellulosolitici:** sono in grado di idrolizzare la cellulosa e le emicellulose, rendendone disponibili i residui monosaccaridici per le fermentazioni intraruminali. Fra le numerose specie s'annoverano: *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium iochhceaeidii*, *Clostridium longisporum*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*.

– **Amilolitici:** idrolizzano l'amido.

Streptococcus bovis, *Bacteroides amylophilus*, *Bacteroides ruminicola*, *Succinogenes amylolitica*, *Selenomonas ruminantium*.

– **Produttori di acido:** producono acido acetico, propionico e butirrico.

Veillonella alcalescens, *Veillonella gazogenes*, *Anaerovibrio lypolitica*, *Selenomonas ruminantium*, *Selenomonas lactylitica*, *Peptostreptococcus elsdenii*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Eubacterium ruminantium*, *Clostridium iochhceaeidii*.

– **Metanogeni:** producono metano, un gas che viene espulso con l'eruttazione e non è utilizzabile dall'animale.

Methanobacterium ruminantium, *Methanobacterium formicium*, e il genere *Methanosarcina*.

– **Lipolitici:** idrolizzano i trigliceridi formando glicerolo ed acidi grassi liberi.

Anaerovibrio lipolytica.

– **Proteolitici:** idrolizzano i legami peptidici delle proteine fornendo amminoacidi liberi.

Butyrivibrio fibrosolvens, *Peptostreptococcus elsdenii*, *Bacteroides ruminicola* e *Selenomonas ruminantium*.

– **Produttori di vitamine:** sintetizzano la vitamina K e vitamine del gruppo B.

1) *Diplodininae*, con sette generi: *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Enaploplastron*, *Metadinium*, *Elystroplastron*, *Polyplastron*;

2) *Epidininae*, con due generi: *Epidinium* ed *Epiplastron*;

3) *Opistrotichinae*, con il solo genere *Opistrotichum*;

4) *Ophryoscolecinae*, con il solo genere *Ophryoscolex*.

Come già menzionato, i protozoi vivono nel rumine grazie alla predazione di batteri e zoospore fungine. La predazione non è né selettiva né specifica, ma avviene con criteri casuali e con un'intensità che dipende dalle concentrazioni batterica e fungina. In particolari condizioni alimentari (diete a base di concentrati misti o solo fieno), i protozoi, con il ridursi della popolazione batterica e fungina, giungono, ad esercitare una reciproca azione fagocitaria. Sono stati distinti due gruppi di ciliati antagonisti: un primo gruppo (tipo A), costituito dai generi *Diploplastron* e *Polyplastron*, ed un secondo (tipo B) da *Epididium* ed *Eudiplodinium*. L'inoculo simultaneo dei due tipi è instabile e l'antagonismo tra tipo A e tipo B porta al prevalere del genere *Polyplastron* (Podestà *et al.*, 1996).

L'ingolfamento da parte dei protozoi dei batteri e di particelle alimentari porta ad un aumento del tempo di ritenzione degli alimenti nel rumine, con un maggior attacco degradativo degli stessi e un minor flusso del digesto al duodeno (Podestà *et al.*, 1996).

La concentrazione di NH₃ ruminale in ruminanti faunati (nei quali è rappresentata la popolazione dei protozoi) rispetto a quella nei defaunati (in cui i protozoi sono stati eliminati usando razioni ricche ad *libitum* di cereali o con agenti chimici) è considerevolmente superiore in ragione di un'aumentata degradazione proteica ed utilizzazione delle catene carboniose degli amminoacidi, nonché del prolungato tempo di ritenzione dell'alimento nel rumine. Con la defaunazione del rumine si osserva un aumento del flusso di composti azotati nel duodeno. Tuttavia, le proteine protozoarie sono caratterizzate da una migliore digeribilità rispetto a quelle batteriche e da un valore nutritivo notevole, per la presenza nel pool amminoacidico di elevate concentrazioni di lisina.

Un ulteriore effetto indesiderabile, legato ai protozoi, è quello derivante dalla compressione sull'accrescimento batterico ruminale a seguito della loro attività predatoria e al loro consumo d'energia (Podestà *et al.*, 1996).

Tuttavia, i protozoi ruminali concorrono alla digeribilità dei costituenti lignocellulosici della parete vegetale, sia perché hanno un'intensa attività degradativa nei confronti di alcuni polisaccaridi vegetali (i ciliati entodimorfi possiedono poliglucosidasi, amilasi, e maltasi), sia attraverso l'influenza che esercitano sulla popolazione batterica. In loro assenza, infatti, la crescita batterica non controllata porta a variazioni tanto considerevoli delle condizioni fisico-chimiche del rumine, da risultare pregiudizievoli per la sopravvivenza degli stessi batteri. Con l'ingolfamento batterico, al contrario, si riduce concomitantemente la quantità di amilopectine, amidocarboidrati, oligosaccaridi e monosaccaridi disponibili per la fermentazione da parte dei lattobacilli.

La presenza di protozoi influisce anche sul destino finale delle catene carboniose di origine glucidica. I maggiori prodotti del metabolismo ossidativo protozoarico nel rumine sono lattato, acetato, butirrato, anidride carbonica, idrogeno molecolare. Il rapporto molecolare fra butirrato e

propionato prodotti a seguito delle fermentazioni ruminali, pari a 1,7 in presenza di protozoi, passa a 0,5 in loro assenza, nel mentre la quantità totale di acidi grassi volatili (VFA) aumenta. Poiché un'elevata disponibilità di propionato favorisce l'accrescimento somatico dell'animale, la defaunazione del rumine è stata proposta a fini zootecnici.

I risultati sulla *performance* animale ottenuti sono stati però contraddittori, come ci si poteva del resto attendere, considerando quanto articolate e complesse siano le interazioni fra le specie microbiche e protozoariche nel rumine.

Infine, questi microorganismi possiedono enzimi in grado di idrogenare acidi grassi insaturi e organuli respiratori che producono idrogeno molecolare (idrogenosomi) (Podestà *et al.*, 1996).

I miceti del rumine

I funghi anaerobi compaiono nel rumine 6-8 giorni dopo la nascita.

Appartengono alla classe *Chytridiomycetes* e sia il loro numero che le specie variano in funzione del tipo di pasto dato all'animale. Con una dieta ad alto contenuto di crusca di cereali, il numero dei miceti anaerobi nel rumine è massimo, con una dieta povera di fibre, la popolazione fungina si riduce fino alla completa scomparsa di alcune specie. In particolare la crescita fungina è stimolata da diete a base di fieno e concentrati ed inibita dalla somministrazione di mais e foraggio (Mariani *et al.*, 1996).

Tra le varie specie comunemente presenti nel rumine ricordiamo:

Neocalimastix frontalis, *Neocalimastix patriciarum*, *Neocalimastix iojonii*, *Anaeromyces micronatus*, *Piromonas communis*, *Orpinomyces bovis*, *Sphaeromonas communis*. Solo tre di queste specie possono essere descritte come tipicamente ruminali: *Neocalimastix patriciarum*, *Anaeromyces micronatus* e *Orpinomyces bovis*.

Il ciclo vitale dei miceti consiste di una fase mobile, nella quale avviene la formazione di zoospore uniflagellate o pluriflagellate, e una fase immobile riproduttiva con formazione di un tallo vegetativo (sporangio) attaccato mediante rizoidi alle particelle vegetali.

Anche i miceti anaerobi ruminali sono coinvolti nel metabolismo degradativo e fermentativo del rumine, come i batteri e i protozoi, ma, al contrario di questi, sono in grado di attaccare e degradare i tessuti lignocellulosici vegetali, che in assenza dei miceti passerebbero indigeriti nelle feci.

L'attività dei miceti ruminali è favorita dal danneggiamento parziale dei tessuti lignificati durante la ruminazione.

La capacità di degradare la lignina non è tuttavia illimitata.

Neocalimastix frontalis, ad esempio, degrada le pareti cellulari vegetali lignificate solo di alcune angiosperme. Più in generale, altre angiosperme, le graminacee e alcune conifere (ad es. *Pinus radiata*) sono resistenti all'attacco degradativo fungino. La diversa disponibilità delle pareti vegetali lignificate alla degradazione dipende dalla loro diversa natura chimica e strutturale. Un'aumentata lignificazione si associa ad una diminuita digeribilità perchè l'attività dei miceti ruminali viene inibita dai composti fenolici, che aumentano con il crescere del grado di lignificazione. Essa, infatti, prende avvio da precursori polifenolici, gli acidi idrossicinnamici (cumarico, ferulico e sinapico), che vengono dapprima ridotti enzimaticamente negli alcoli corrispondenti (cumarilico, coniferilico e sinapilico) e quindi condensati, in un processo ossidativo, in macromolecole reticolate tridimensionali, *le lignine*.

I miceti, infine, instaurano con i batteri metanogeni una simbiosi mutualistica. I miceti ricavano dai batteri un aumento della velocità di idrolisi della cellulosa dei tessuti vegetali, che rendendo disponibile glucosio solubile, favorisce il benessere e la proliferazione fungina. A loro volta, i metanogeni sfruttano l'idrogeno prodotto negli idrogenosomi posseduti anche da queste specie cellulari per produrre metano

(Mariani *et al.*, 1996).



Fig 22 - Lattifere che si alimentano.

2.6 I bovini come portatori asintomatici di batteri patogeni e batteri alteranti per gli alimenti

La cute degli animali in generale e in particolare quella insozzata di escrementi in particolare, possono rappresentare una fonte di contaminazione della carcassa durante le attività di macellazione. A seconda del sito anatomico considerato, la concentrazione dei microrganismi sulla superficie della cute varia tra 10^4 e 10^9 germi/cm². In genere le contaminazioni più importanti si rilevano sulle superfici su cui poggia l'animale nelle fasi di riposo (ventre e punta del petto), considerando che il suolo e la lettiera costituiscono le più probabili sorgenti di contaminazione della cute. La popolazione batterica che si ritrova sulla cute dei bovini può derivare dal suolo, dall'acqua, dalla vegetazione e dalle feci e vi possono essere rappresentate specie patogene per l'uomo quali *Escherichia coli* O157:H7 verocitotossici, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp. e *Listeria monocytogenes*. Le condizioni di allevamento, la stagione, le modalità di trasporto etc, possono influenzare il trasferimento di questi microrganismi dall'intestino alla cute degli animali, e da questa, durante le attività di macellazione, alla carcassa. La positività della cute ai diversi microrganismi varia a seconda degli studi tra 0 e 80%, 15,4 e 100%, 37,7 e 75,5%, 13 e 25% rispettivamente per *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* termofili, con una variabilità dovuta sia al momento (allevamento, dopo il trasporto, alla stalla di sosta, dopo l'abbattimento, stagione) che al punto della cute in cui viene effettuato il campionamento. I batteri possono essere trasferiti durante il processo di macellazione dalla cute alla carcassa per contatto diretto o indirettamente attraverso le mani degli operatori, i vestiti, gli utensili e i macchinari. Al fine di evitare l'introduzione di microrganismi patogeni nella filiera delle carni, risulta dunque importante assicurare che gli animali vengano presentati alla macellazione in condizioni di pulizia adeguate (Gabriella Conodera *et al.*, 2007).

Gli agenti patogeni

I ceppi di **Escherichia coli** produttori di verocitotossina o Shiga-tossina (VTEC oppure STEC) sono patogeni enterici che producono una potente tossina responsabile di gravi forme morbose nell'uomo. Esistono numerosi sierotipi VTEC, individuati attraverso gli antigeni somatico O e flagellare H. Sebbene si conoscano oltre 100 sierotipi VTEC, solo alcuni sono stati associati frequentemente a malattia grave nell'uomo. Tra questi, il più noto e diffuso è il sierogruppo O157 seguito da O26, O145, O111, O121, O103. Questi sierogruppi sono generalmente caratterizzati dalla presenza di fattori di virulenza aggiuntivi alla VT, in particolare la capacità di aderire e colonizzare la mucosa intestinale (gene *eae*), e vengono chiamati entero-emorragici (EHEC) in relazione alla malattia clinica che causano nell'uomo (Gabriella Conodera *et al.*, 2007).

La manifestazione clinica associata a infezione da VTEC varia dalla diarrea acquosa, alla colite emorragica e alla Sindrome Emolitico Uremica (SEU). Quest'ultima è la manifestazione più grave delle infezioni da VTEC e colpisce soprattutto i bambini. È generalmente legata agli stipiti VTEC produttori di verocitotossina di tipo 2 (portatori del gene *vtx2*).

La SEU rappresenta la causa più importante di insufficienza renale acuta nell'età pediatrica, in particolare nei primi anni di vita. È caratterizzata da anemia emolitica, piastrinopenia e insufficienza renale acuta di grado variabile, sino alla necessità di trattamento dialitico sostitutivo. Il 25-30% dei pazienti colpiti da SEU può essere interessato da complicazioni neurologiche. Nella fase acuta, la SEU può essere fatale nel 3-5% dei casi e una percentuale simile può sviluppare insufficienza renale cronica (Gabriella Conodera *et al.*, 2007).

I VTEC sono considerati agenti di zoonosi poiché i ruminanti, in modo particolare il bovino, sono portatori asintomatici di questi batteri e costituiscono il loro *reservoir* naturale.

L'infezione all'uomo si trasmette attraverso l'ingestione di alimenti o acqua contaminati o per contatto diretto con gli animali. Tra gli alimenti contaminati più a rischio ci sono la carne cruda o poco cotta, il latte non ben pastorizzato, formaggi e altri derivati a base di latte non pastorizzato. Anche i vegetali (frutta e ortaggi e germogli) e i succhi di frutta possono veicolare l'infezione, come dimostrato dalle numerose epidemie legate a questi tipi di alimento (spinaci, lattuga, germogli di erba medica). La contaminazione dei vegetali avviene soprattutto attraverso pratiche di fertirrigazione e comunque attraverso la contaminazione con reflui zootecnici. Un'altra via di

trasmissione delle infezioni da VTEC è quella oro-fecale da persona a persona. Questa via necessita di un contatto stretto tra gli individui ed è quindi molto spesso riportata nell'ambito familiare e scolastico (scuole d'infanzia e comunità) (Gabriella Conodera *et al.*, 2007).

La gravità della malattia dipende dalle caratteristiche di virulenza del ceppo infettante, dall'età e condizioni generali del paziente e dalla dose infettante, che può essere anche molto bassa (inferiore a 100). Il tempo d'incubazione di circa 3 / 4 giorni, può variare tra i 2 e gli 8 giorni. Anche nei casi complicati dalla SEU l'esordio sintomatologico è generalmente caratterizzato da diarrea spesso ematica, accompagnata da dolore addominale intenso e vomito. La febbre, se presente, raramente supera i 38°C. Nei casi non complicati la malattia ha carattere autolimitante con una durata compresa tra 2 e 4 giorni. Le complicanze tipiche della SEU si manifestano a seguito del passaggio nel torrente circolatorio della tossina liberata nel lume intestinale (Gabriella Conodera *et al.*, 2007).

Non esiste terapia specifica nei confronti dei VTEC e le infezioni vengono trattate con terapie di supporto (reidratazione, emodialisi e/o dialisi peritoneale, plasmferesi, emotrasfusioni). La terapia antibiotica è sconsigliata o addirittura controindicata poiché potrebbe favorire il rilascio della tossina con peggioramento delle manifestazioni cliniche. Le carni fresche ed i prodotti carnei *ready-to-eat* sono una delle principali vie di trasmissione di *Listeria monocytogenes* all'uomo, particolarmente in persone immunocompromesse, ma anche in soggetti immunocompetenti, sebbene con prevalenze e quadri clinici differenti fra loro.

Si stima, infatti, che tra i soggetti ipoergici colpiti da listeriosi si può raggiungere una letalità del 30-50%, con quadri neurologici e setticemici. Nelle donne in gravidanza, il batterio può colpire anche il feto in utero, con gravi danni sistemici, possibile morte e conseguente aborto. In Inghilterra e Galles tra il 1996 e il 2000, si sono registrati 221 casi di listeriosi, con ben 78 decessi. Tra agosto e settembre 2008, in Canada, in seguito al consumo di prodotti carnei, si sono avuti 56 casi di listeriosi con 20 morti (Gabriella Conodera *et al.*, 2007).

2.6.1 I patogeni emergenti e il latte crudo

I batteri ambientali sono una sicura fonte di problemi per la sanità della mammella. Inoltre tra essi si possono nascondere altri patogeni agenti di tossinfezione alimentare che possono causare problemi di contaminazione del latte consumato crudo (senza pastorizzazione o bollitura). Nel V convegno organizzato dal *Mastis Council Italia* (MCI) su questo tema sono stati considerati i patogeni di più recente e quindi definiti emergenti, per evidenziare i potenziali pericoli e i mezzi più idonei al loro controllo.

Il prof. Raul A. Almeida (Università di Tennessee) ha introdotto il tema come i casi di tossinfezione alimentare siano aumentati negli ultimi vent'anni con punte di 33 milioni di casi/anno e 9.000 morti/anno negli Usa (Gabriella Conodera *et al.*, 2007).

Le ragioni di tale aumento sono identificabili in:

- 1.** fattori economici (globalizzazione dei mercati, maggiore consumo di alimenti importati, nuove abitudini alimentari);
- 2.** fattori sociali (aumento delle malattie immunosoppressive, aumento dell'età delle popolazioni);
- 3.** fattori microbici (comparsa di ceppi molto virulenti, aumento dell'antibiotico resistenza e presenza di reservoirs nei siti di produzione degli alimenti);
- 4.** fattori produttivi (nuove metodologie produttive, aumento del consumo di alimenti crudi e in alcuni paesi, la riduzione dell'attività ispettiva da parte dell'autorità sanitarie).

In questo quadro risulta utile riassumere le caratteristiche epidemiologiche dei principali patogeni emergenti.

2.6.2 *E. coli* O157:H7

Le relazioni delle dott.sse Gabriella Conodera (IzsVe, 2007) e Gaia Scavia (Iss, 2007) hanno contribuito a fare il punto della situazione italiana in relazione a *E. coli* O157:H7 e al suo controllo negli allevamenti. Infatti il bovino può veicolare il patogeno all'uomo attraverso il consumo di carni crude o poco cotte e di latte crudo o pastorizzato in modo inadeguato. Nel bovino si localizza nel rumine, colon e retto, senza dare patologie evidenti e con un' escrezione intermittente, talvolta di breve durata (1-2 mesi). La prevalenza di animali escretori in allevamento è molto variabile ed è condizionata da fattori esogeni come stagione, dieta, tipo di stabulazione e fattori stressanti. Da sottolineare come la contaminazione degli ambienti, compresa l'acqua di abbeverata, può contribuire alla sua diffusione. Più in generale l'igiene dell'allevamento, e della mungitura in particolare, assumono una grande importanza, poiché si ritiene che proprio in quest'ultima sede avvenga la contaminazione del latte da parte delle feci dei bovini portatori.

La patologia nell'uomo è grave, ed è caratterizzata da una grave sindrome uremica emorragica (SEU) nei bambini, che può anche portare a morte. Per quanto riguarda in particolare la presenza di *E. coli* O157:H7 nel latte e nei prodotti lattiero-caseari, questa è molto variabile da Paese a Paese. Da sottolineare come una volta presente nel latte, *E. coli* può moltiplicarsi a temperature superiori a 5°C e persistere nei formaggi alcuni mesi. Si ritiene quindi che la stagionatura non sia sufficiente per eliminarlo e neppure l'azione acidificante dei batteri lattici. Va tuttavia segnalato che una recente indagine su 3.000 prodotti lattiero-caseari effettuata nel nostro Paese non ha evidenziato alcuna positività per *E. coli* O157:H7 (Gabriella Conodera *et al.*, 2007).

2.6.3 Salmonellosi

La salmonellosi è la seconda zoonosi per frequenza nei Paesi europei con un'incidenza di 42,2 casi/100.000 abitanti. Come sottolineato da Barberio (IzsVe, 2007), i serovars maggiormente implicati sono *S. enteritidis* (76%) e *S. typhimurium* (14%), e i focolai sono per lo più associati al consumo di uova crude o poco cotte e carne contaminata, tuttavia anche il latte contaminato è coinvolto in alcuni focolai di salmonellosi. Purtroppo negli scorsi anni sono comparsi ceppi particolarmente virulenti di *S. typhimurium* (DT104) che presentano una resistenza multipla agli

antibiotici. Negli allevamenti bovini colpiti si osservano un'elevata mortalità e morbilità, che riguardano sia animali giovani che adulti con enteriti gravi. I soggetti colpiti eliminano *Salmonella* per periodi lunghi (fino a 3 anni) anche nel latte. In un recente focolaio avvenuto nel Veneto, sono state effettuate indagini per identificare le potenziali fonti di contaminazione, riscontrando una positività nella maggior parte dei campioni prelevati, con un'alta frequenza ovviamente nelle feci, ma anche alimenti del bestiame, acqua di abbeverata e latte sono risultati positivi. In questa situazione sono state adottate una serie di misure per prevenire l'ulteriore diffusione della malattia tra le quali:

- 1.** verifica bimestrale della presenza di *Salmonella* nelle feci;
- 2.** divieto di movimentazioni animali;
- 3.** isolamento degli animali eliminatori;
- 4.** stabulazione dei vitelli in gabbietta singola;
- 5.** sala parto separata per soggetti non eliminatori;
- 6.** massima igiene delle strutture e delle attrezzature;
- 7.** rimozione giornaliera delle deiezioni dai locali di stabulazione;
- 8.** derattizzazione;
- 9.** utilizzo del latte solo dopo pastorizzazione;
- 10.** divieto di accesso in azienda di persone a categorie a rischio;

Con queste misure è stato possibile controllare ed eradicare la malattia dall'allevamento senza sospendere la consegna del latte, a conferma che una corretta e puntuale gestione sanitaria dell'allevamento può permettere il controllo anche di questo tipo di patologie (Gabriella Conodera *et al.*, 2007).

2.6.4 *Listeria monocytogenes*

Questo microorganismo è quello che preoccupa maggiormente gli allevatori americani poiché sta aumentando la frequenza delle segnalazioni di positività. Infatti *L. monocytogenes* è diffusa ampiamente nell'ambiente, viene escreta nel latte, nelle feci, nel sangue dei bovini colpiti, anche in assenza di manifestazioni cliniche. Le potenziali fonti di contatto per l'uomo sono diverse: dai vegetali al pesce, ma anche il latte e i prodotti lattiero-caseari rappresentano una delle principali fonti.

Come riportato da Paolo Daminelli (IzSLer, 2007), una recente ricerca ha verificato la presenza di *L. monocytogenes* nel latte di massa di allevamenti lombardi. Su un totale di 131 campioni, la ricerca di Dna batterico (PCR) è risultata positiva nel 2,62 % dei casi, ma solo lo 0,29% di questi campioni è risultato positivo all'esame microbiologico tradizionale. Da sottolineare che la ricerca di Dna risulta positiva anche se il batterio è morto, a differenza di quanto accade, con l'esame batteriologico tradizionale. La stessa indagine rivolta al prodotto confezionato e quindi pronto al consumo ha dato una positività dello 0,92% alla PCR e la completa assenza all'esame microbiologico.

Infine le analisi effettuate sul latte destinato alla vendita diretta hanno mostrato una positività alla PCR del 13,95 % e del 1,53 % all'esame microbiologico. In questo ambito da sottolineare come l'eventuale crescita della *Listeria* nel prodotto contaminato dipenda non tanto dalla concentrazione iniziale, quanto dal tempo e dalla temperatura di conservazione del prodotto. In questa situazione, quindi, il ruolo dell'informazione e dell'educazione igienica del consumatore rappresenta un fattore importante per ridurre i rischi per quest'ultimo (Gabriella Conodera *et al.*, 2007).

2.6.5 *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis

Un discorso completamente diverso dai precedenti dev'essere fatto per *M. avium subsp. paratuberculosis* (MAP), ovvero l'agente della paratuberculosis (JD). Recenti indagini hanno evidenziato come la patologia nel bovino sia largamente diffusa, con valori di prevalenza a livello di allevamento superiore al 35 % negli allevamenti con più di 100 capi. Lo stesso microorganismo è da alcuni ritenuto responsabile anche di una patologia umana conosciuta come morbo di Chron (CD). Tuttavia, le informazioni a proposito sono tuttora discordanti e nell'ambito scientifico la discussione è ancora molto accesa. Come ha infatti sottolineato da Vicenzoni (IzsVe), se vi sono argomenti a favore, ve ne sono altri sicuramente, contrari a tale ipotesi. MAP è da considerarsi sicuramente causa della paratuberculosis del bovino, ma un suo eventuale ruolo nel morbo di Chron è ancora da accertare (Gabriella Conodera *et al.*, 2007).

2.6.6 *Reservoir* di patogeni emergenti nel latte crudo

L'importanza dei diversi patogeni sopra citati e la loro pericolosità per la salute umana, con la sola eccezione di MAP, è accertata. L'individuazione dei potenziali reservoir a livello di allevamento e le vie di contaminazione del latte crudo rappresentano quindi due aspetti molto importanti per poter intervenire nell'evitare che il consumatore possa venire a contatto con tali patogeni.

In ragione Lombardia sono presenti oltre 200 distributori del latte crudo ed una serie d'indagini, come riportato dal dott. Varisco (Izs di Brescia, 2007) ha permesso di valutare la presenza dei diversi patogeni emergenti in tale prodotto. Nel corso del 2005 e 2006 sono state effettuate oltre 9000 analisi su campioni di latte crudo provenienti da 143 stalle. Tali analisi hanno dimostrato seppure con frequenze molto basse, la presenza di alcuni patogeni potenzialmente causa di tossinfezioni alimentari.

L'importanza dell'individuazione dei *reservoir* a livello d'allevamento diviene quindi un aspetto fondamentale per poter ridurre o, meglio, evitare che tali patogeni siano presenti nel latte crudo. A

questo proposito sono molto interessanti le indagini svolte dal professor Almeida in diversi allevamenti del Tennessee.

In tali indagini sono stati raccolti campioni sia dall'ambiente che dagli animali per individuare i reservoir principali per tali patogeni. Sono stati raccolti 691 campioni che hanno portato all'isolamento di *L. monocytogenes* nel 6,5 %, di *Campylobacter spp* nel 4,8 %, di *Salmonella spp* nel 3,8 % e di *E. coli* O157:H7 nello 0,7 % dei casi. È sicuramente interessante vedere come i diversi patogeni siano presenti con sedi e frequenze diverse all'interno dell'allevamento. Questi risultati non fanno altro che ribadire l'importanza di una corretta igiene in tutte le fasi dell'allevamento e del fatto che la principale fonte di entrata dei patogeni nel latte sia, ancora una volta, rappresentata dalle feci (Gabriella Conodera *et al.*, 2007).

Una corretta gestione igienico sanitaria dell'allevamento è il metodo più efficace per poter ridurre la pressione microbica a livello d'allevamento e prevenire la contaminazione del latte. La vendita di latte crudo e di prodotti lattiero-caseari a base di latte crudo rappresenta un'importante fonte di reddito per gli allevatori, e sta riscuotendo un crescente interesse da parte dei consumatori, riavvicinandoli al mondo agricolo. I dati presentati nel corso del convegno organizzato dal MCI confermano la generale ottima qualità del latte. Tuttavia, la presenza di positività per alcuni patogeni emergenti, possibile causa di tossinfezione alimentare, conferma la necessità di mettere in atto a livello d'allevamento procedure idonee a ridurre la potenziale contaminazione del latte. Tali procedure, inquadrabili in un programma di gestione sanitaria, rappresentano la fondamentale sintesi, tra l'attività veterinaria e quella zootecnica, al fine di garantire un prodotto sano e di qualità a tutela del reddito degli allevatori e della salute del consumatore (Gabriella Conodera *et al.*, 2007).

2.6.7 Microorganismi alteranti.

I bovini possono anche essere portatori asintomatici di microorganismi alteranti per gli alimenti, come ad esempio, quelli appartenenti al genere: *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Brochothrix*, *Serratia*, *Hafnia*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Torulopsis*.

Rigonfiamento delle carni confezionate da Clostridi

Una grande importanza rivestono i Clostridi, che possono alterare le carni confezionate refrigerate sottovuoto di bovino, suino e di volatili. In questi tipi d'alimenti, si può rinvenire un grosso rigonfiamento della confezione dovuta ad un'elevata produzione microbica di CO₂, all'apertura si può sentire un'odore solforoso dovuto alla produzione microbica di H₂S, oppure a volte, anche un'odore di fruttato oppure di acidulo o di solvente; e una colorazione verde delle carni e del liquido fuoriuscito da esse.

I clostridi psicotrofi causa del rigonfiamento di confezioni di carne refrigerata sottovuoto finora identificati sono:

- C. algidicarnis* (Lawson e coll., 1994),
- C. frigidicarnis* (Broda e coll., 1999),
- C. algidixilanolyticum* (Broda e coll., 2000).

Altri clostridi psicotrofi sono: *C. akagi*, *C. acidi soli* e *C. lituseburensis* (cluster XIVa).

I singoli ceppi elaborano varie sostanze volatili quali:

- *C. estertheticum*: butanolo, ac. butirrico, ac. acetico e butilesteri +H₂S .
- *C. estertheticum* subsp. *lameraniense*: ac. acetico (72,4%), ac. butirrico (26,4%), ac. propionico (0,3%), ac. isobutirrico (0,9%) + H₂S.
- *C. frigoriphilum*: ac. butirrico, ac. etanolo.
- *C. gasigenes*: etanolo, acetato, butirrato, butanolo.
- *C. algidicarnis*: ac. butirrico, ac. acetico, ac. 2-metilpropionico , ac. 2-metilbutirrico, ac. 3-metilbutirrico.
- *C. frigidicarnis*: ac. acetico (43-45 mM), etanolo (19-20 mM), ac. butirrico (18-20 mM), ac.

isovalerico (6-7 mM), butanolo (4-5 mM).

- *C. algidixilanolyticum*: ac. acetico, ac. formico, etanolo, ac. butirrico, butanolo

Le alterazioni organolettiche delle carni confezionate refrigerate sottovuoto possono essere causate anche da *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Brochothrix* e *Bacillus*

(www.internationalpbi.it/docs/PBI/seminari/relazioni/batteri-alteranti.pdf).

Gonfiore tardivo del Parmigiano-Reggiano e del Grana Padano

Il Parmigiano Reggiano è un prodotto a base di latte crudo, sottoposto a lunga stagionatura, ciò lo espone maggiormente a difetti non facilmente eliminabili. L'alterazione che, più frequentemente, colpisce le produzioni casearie è conosciuta come gonfiore tardivo e consiste in una disorganizzazione della pasta che presenta occhiature, fessurazioni, sfogliature e aperture a carattere cavernoso nella parte centrale della forma e, talora, una consistenza spugnosa. Tali difetti se marcati possono compromettere la struttura del prodotto ed essere accompagnati da sapori ed odori sgradevoli, dovuti alla produzione di acido butirrico ed aldeide acetica. La fermentazione butirrica, che si verifica in differenti tipi di formaggi a pasta dura o semi-dura come Parmigiano Reggiano, Grana Padano, Provolone, Emmenthaler, Asiago, Montasio e Fontina dequalifica notevolmente la qualità ed il valore commerciale del prodotto.

Il gonfiore tardivo inizia, qualche settimana o mese dopo la produzione del formaggio, durante la stagionatura, cioè quando le condizioni fisicochimiche della pasta diventano ottimali per lo sviluppo dei clostridi, i principali agenti eziologici responsabili di questa alterazione. I clostridi che interessano le produzioni casearie sono ascrivibili al gruppo dei butirrici, ulteriormente suddivisibile in

due sottogruppi fisiologici: i saccarolitici (*Clostridium tyrobutyricum* e *Cl. Butyricum*) con spiccata capacità fermentativa degli zuccheri e degli acidi organici e i proteolitici (*Cl. sporogenes* e *Cl. bifermentans*) che provocano la liberazione di aminoacidi, sui quali esercitano azioni di deaminazione, decarbossilazione, ossidazione e riduzione.

La comparsa del gonfiore tardivo è legata al numero di spore, in particolare di *Cl. tyrobutyricum*, inizialmente presenti nel latte. La soglia critica di questo valore si attesta ad un livello superiore a 200 spore/l. La presenza di questa microflora è una conseguenza dell'inquinamento ambientale, della qualità degli insilati e delle cattive pratiche di mungitura. La germinazione delle spore e, conseguentemente, l'insorgenza

del difetto è favorita da acidificazioni lente accompagnate da un innalzamento graduale del

potenziale redox, anche se il loro numero iniziale risulta inferiore alla soglia critica.

Altre forme di gonfiore tardivo sono dovute a *Cl. sporogenes*. Tale microrganismo proteolitico provoca nella pasta la formazione di zone biancastre centrali ed estese, associate ad odore nauseabondo, compromettendo l'impiego del prodotto. I clostridi butirrici possono generare anche gonfiore precoce prima della salatura; tale

difetto si può riscontrare nei formaggi Grana, soprattutto nel periodo estivo. Le condizioni chimico-fisiche che presenta il formaggio fresco, favoriscono il rapido sviluppo di *Cl. butyricum*, che genera cavità spugnose marcate e localizzate irregolarmente nella pasta del formaggio. In letteratura, sporadicamente, anche *Cl. Perfringens* viene segnalato come responsabile del gonfiore precoce.

La gravità del difetto dipende, oltre che dal grado della fermentazione butirrica, anche dalle modalità di lavorazione dei formaggi. Se non presentano gravi alterazioni organolettiche i formaggi possono essere utilizzati per la produzione di grattugiato o porzionato, in caso contrario devono essere esclusi dall'alimentazione umana (Bacci et al., 2002).



Fig 23 - Gonfiore tardivo del *Parmigiano Reggiano*.

Tab 10. Risultati delle indagini microbiologiche effettuate su campioni di latte crudo (Gabriella Conodera *et al.*, 2007).

| Analisi | Tecnica | Presenza | Assenza | Totale | %pos |
|--|----------------------|-----------------|----------------|---------------|-------------|
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Microbiologico e PCR | 10 | 574 | 584 | 1,71 |
| <i>Campylobacter spp (jejuni e coli)</i> | Microbiologico e PCR | 2 | 887 | 888 | 0,29 |
| <i>Campylobacter termotolleranti</i> | Microbiologico e PCR | 0 | 2 | 2 | 0 |
| <i>Listeria spp</i> | Microbiologico e PCR | 131 | 558 | 887 | 19,07 |
| | | 15 | 114 | 129 | 11,83 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Microbiologico e PCR | 18 | 111 | 129 | 13,85 |
| | | 2 | 128 | 131 | 1,53 |
| <i>Salmonella spp</i> | Microbiologico e PCR | 11 | 874 | 885 | 1,81 |
| | | 1 | 10 | 11 | 9,09 |
| Sostanze inibenti | Kit pronto uso | 2 | 887 | 889 | 0,29 |



Fig 24 - Sala mungitura di vacche da latte.

Tab 11. Distribuzione dei diversi patogeni all'interno dell'allevamento

(Gabriella Conodera *et al.*, 2007).

| Sito | <i>Listeria</i> | <i>Salmonella</i> | <i>Campylobacter</i> | <i>E.coli 0157:7</i> |
|--------------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Lettiera | 28,80% | 43,30% | 14,30% | |
| Vasca liquami | 15,50% | 7,70% | 37,10% | |
| Liquami corsia | 31,10% | 15,40% | 20,00% | 40,00% |
| Insilato | 13,30% | 11,50% | 2,90% | 2,90% |
| Feci uccelli | 4,40% | 7,70% | 2,90% | 20,00% |
| Filtri mungitrice | 2,20% | 3,80% | | |
| Feci vitelli | 2,20% | 7,70% | 11,40% | 20,00% |
| Feci manze | | | 2,90% | |
| Acqua | 2,20% | 11,50% | | |
| Topi | | 11,50% | | |
| Pavimento sala mungitura | | | 8,80% | |

2.7 Flora microbica del latte di vacca

2.7.1 Latte

Il latte, data la sua composizione chimica, rappresenta un ottimo terreno colturale per la maggior parte dei microorganismi e come tale viene largamente utilizzato in batteriologia per l'identificazione dei batteri. Lo sviluppo microbico in questo substrato determina una serie di modificazioni chimiche che danno luogo a veri e propri processi alterativi che ne pregiudicano la commestibilità, oppure a modificazioni utili che portano alla preparazione di nuovi prodotti alimentari, come nel caso dei latti fermentati e dei formaggi (Tiecco, 2000).

Il latte, quando prelevato in buone condizioni da un animale sano, contiene un numero limitato di microorganismi in genere

$< 10^3$ /ml e < 1 coliformi/ml. Si tratta di germi saprofiti della mammella e dei canali galattofori rappresentati dai micrococchi, streptococchi lattici e lattobacilli (Tiecco, 2000).

Nel caso che l'animale presenti una mastite, nel latte sono presenti gli agenti eziologici dello stato morbosso (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *E. coli*, *Corynebacterium pyogenes*, *Mycoplasma*, *Nocardia asteroides*). Va subito precisato, tuttavia, che il latte mastitico non può essere considerato un alimento ma piuttosto un prodotto patologico utile per finalità diagnostiche (Tiecco, 2000).

Nel latte possono tuttavia essere presenti anche altri agenti patogeni per l'uomo, quali *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella spp.*, *Salmonella spp.*, *L.monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Coxiella burneti*, ecc...

Gli inquinamenti più massivi sono quelli che si verificano dall'ambiente esterno attraverso il meato del capezzolo; i microorganismi attraverso questa via possono risalire fino al seno galattoforo; lungo questo tragitto può verificarsi una certa selezione delle varie specie microbiche per cui alcune rimangono inattive o vengono fagocitate, mentre altre possono moltiplicarsi.

Comunque il latte, raccolto sterilmente da mammelle, in perfetto stato di salute, risulta sempre modestamente inquinato, le cariche microbiche, infatti, calcolate sulla massa totale del latte raccolto in una mungitura sono sempre molto modeste, nell'ordine di 100-500 germi/ml. È stato dimostrato, inoltre, che il tenore dei germi decresce con il progredire della mungitura; di regola i primi getti della mungitura sono sempre quelli maggiormente inquinati (il loro contenuto può raggiungere e superare i 1000 germi/ml) mentre gli ultimi germi possono risultare addirittura sterili (Tiecco,

2000).

Il latte nel corso della mungitura, del trasporto e dello stoccaggio alla stalla o allo stabilimento di lavorazione subisce la contaminazione da parte di una gran varietà di microorganismi. Non tutti saranno in grado di moltiplicarsi: le specie che saranno in grado di riprodursi sono fondamentalmente condizionate dalla temperatura di conservazione.

La flora microbica del latte, pertanto, può variare da un campione all'altro in funzione in parte del prevalere di una fonte di contaminazione o di un'altra e soprattutto dell'età del latte e condizioni di conservazione.

Le principali fonti di contaminazione del latte durante e dopo la mungitura sono molteplici e possono essere suddivise in varie categorie (Tiecco, 2000).

– **cause dovute all'animale:** la superficie della mammella, la cute dell'animale in genere e le mani del mungitore rappresentano la prima fonte di contaminazione del latte. Detriti di pelle, peli, scaglie, sudiciume che aderisce alla pelle dell'animale, materiali questi sempre fortemente contaminati, possono, durante la mungitura, venire inglobati nel latte (determinando poi quello che va sotto il nome di sudiciume del latte) causando così un notevole aumento della carica microbica. Lavori sperimentali di vecchia data hanno dimostrato, infatti, che le cariche microbiche del latte raccolto senza il rispetto delle più elementari norme igieniche (lavaggio della mammella prima della mungitura, ecc...) potevano raggiungere e superare il milione di germi per ml. Questa contaminazione è rappresentata da: enterobatteri, *Bacillus*, *Clostridium*.

Per quanto riguarda la contaminazione del latte operata dal mungitore i microorganismi sono gli stafilococchi presenti sulle mani, germi di espettorazione e di contaminazione fecale.

Notevole importanza riveste l'inquinamento fecale sia per l'insudiciamento del capezzolo sia, soprattutto, per quello della coda dell'animale. Conseguentemente, notevole importanza riveste l'alimentazione dell'animale lattifero, essendo noto che il tipo d'alimentazione influenza direttamente il contenuto microbico delle feci. Gli alimenti, come pure la lettiera, rappresentano una fonte di contaminazione potendo apportare oltre una flora banale, anche lattobacilli e *Clostridium butyricum*.

– **Cause dovute all'ambiente:** il contenuto microbico dell'aria varia entro limiti molto ampi e dipende in gran parte dalle condizioni ambientali in genere. Anche nelle stalle la carica microbica dell'aria varia a seconda del momento in cui viene stabilita; i massimi valori si ottengono durante la distribuzione del fieno, mentre i valori minimi si ricavano quando nella stalla non viene effettuata alcuna operazione manuale.

Il contenuto microbico dell'aria dipende dalla quantità di pulviscolo atmosferico presente per cui si

può affermare che tutte le operazioni che aumentano la quantità di pulviscolo portano ad un aumento della carica microbica. Sotto questo aspetto, quindi, anche il tipo di lettiera su cui gli animali sono tenuti riveste grande importanza, essendo noto che le cariche microbiche delle lettiere variano notevolmente con il tipo di materiale (paglia, foglie, segatura, ecc...) utilizzato.

I tipi di microorganismi presenti nell'aria, e che possono contaminare il latte, sono molti e sono già stati ricordati nella parte generale.

Anche il suolo può rappresentare una fonte di contaminazione; le specie microbiche coinvolte in questo tipo di contaminazione sono rappresentate da *Streptomyces*, batteri sporulati, spore di funghi.

– **Cause dovute al sistema di mungitura:** la mungitura manuale comporta sempre un certo inquinamento del latte, poiché è stato dimostrato che la superficie della mano è sempre abbastanza inquinata, tanto che in alcuni casi può raggiungere anche centinaia di milioni di germi. La mungitura meccanica può eliminare molti inconvenienti, tuttavia, spesso, per mancanza di un'accurata igiene delle apparecchiature, può risultare controproducente e rappresentare la fonte delle contaminazioni più massiva.

– **Cause dovute ai recipienti di raccolta:** i recipienti di raccolta del latte, come pure quelli usati per la sua filtrazione, rivestono un'enorme importanza sulla microbiologia del latte stesso. Recipienti sporchi o mal puliti possono presentare un contenuto microbico che può raggiungere svariati milioni per cm e quindi contaminare in maniera massiva il latte in essi versato. Anche la natura del materiale con cui questi recipienti sono fatti riveste una certa importanza; i recipienti in legno sono quelli che determinano i più forti inquinamenti data la difficoltà di operare appropriati lavaggi di essi.

In definitiva, possiamo dire che, pur essendo molteplici le fonti d'inquinamento del latte durante la mungitura, qualora questa operazione venga effettuata rispettando le più strette norme igieniche, le cariche microbiche sono sempre limitate e contenute entro limiti accettabili, raggiungendo solo raramente valori dell'ordine di 10^4 - $5 \cdot 10^4$ UFC/ml di latte. L'entità della sua contaminazione dipende dal maggiore o minore rispetto delle condizioni igieniche.

Le specie microbiche coinvolte sono rappresentate da streptococchi lattici, micrococchi, lattobacilli, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, lieviti.

Dal punto di vista qualitativo, la flora microbica del latte presenta notevoli variazioni dipendenti in maniera particolare dal prevalere di una o dell'altra fonte di contaminazione (Tiecco, 2000).

Tab 12. Contaminazioni microbiche della stalla (Tiecco, 2000).

| Igiene | UFC/ml | Provenienza contaminazione % Mammella | Provenienza contaminazione % Capezzolo | Provenienza contaminazione % Apparecchiature | N. cellule/ml |
|---------|---------|---|---|---|---------------|
| Buona | 10000 | 2 | 48 | 50 | 200000 |
| Media | 50000 | 2 | 40 | 58 | 400000 |
| Cattiva | 1000000 | 0,2 | 10 | 89,8 | 1000000 |

I più importanti gruppi microbici presenti nel latte, in generale, sono i fermenti lattici, propionici butirrici, varie specie di bacilli capaci di attaccare la caseina o i suoi derivati (germi peptonizzanti), germi lipolitici, germi termofili o termodurici (capaci di sopportare il normale processo di pastorizzazione), lieviti (*Saccharomyces*, *Candida*), eumiceti rappresentati da *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, ecc... Il latte può contenere però agenti filtrabili, fra i quali rivestono notevole interesse dal punto di vista tecnologico i *batteriofagi* (Tiecco, 2000).

Il latte dopo la mungitura e durante la conservazione subisce varie modificazioni del contenuto microbico; infatti nelle prime ore successive alla mungitura si nota una diminuzione della flora microbica dovuta alla presenza di sostanze dotate di potere battericida, sulla cui natura ancora poco è noto. Questo potere battericida, che viene distrutto con il riscaldamento, può essere prolungato nel tempo conservando il latte alla temperatura di refrigerazione. In questo stadio, quindi si può verificare una riduzione di varie specie microbiche fra le quali i batteri lattici.

Il latte raccolto dalle singole bovine viene quindi mescolato per costituire il cosiddetto *latte di massa* e conservato in attesa del suo invio ai centri di raccolta i quali possono essere rappresentati da centrali del latte, per la produzione del cosiddetto latte di consumo, oppure da stabilimenti industriali per la successiva trasformazione (Tiecco, 2000).

In genere il latte di stalla viene sottoposto subito a due trattamenti:

a) filtrazione, per rimuovere l'eventuale sudiciume in esso pervenuto durante la mungitura; questa operazione è prevista dal Decreto 17 giugno 2002 che riguarda il trattamento di microfiltrazione nel processo di produzione del latte alimentare, che ha sostituito l'art. 18 del regolamento sulla

vigilanza igienica del latte. Ad essa, tuttavia, sarebbe preferibile la centrifugazione. Con la filtrazione non si migliorano minimamente le condizioni microbiologiche del latte; dopo questa operazione in genere si osserva anzi un aumento delle unità formanti colonie, forse come conseguenza della disgregazione degli ammassi dei germi (Tiecco, 2000).

b) raffrescamento, in appositi serbatoi; non solo per ritardare lo sviluppo microbico, ma anche per esaltare l'attività delle sostanze inibenti naturalmente presenti nel latte, le quali, come già ricordato, presentano un'attività molto limitata nel tempo. Prima dell'introduzione della pratica, la flora dominante del latte era costituita da batteri lattici. Oggi invece con la conservazione allo stato refrigerato viene a prendere il sopravvento il gruppo dei germi psicrotrofi.

La refrigerazione, pertanto, ha ridotto l'inacidimento spontaneo del latte per cui sarà necessario procedere all'innesto con particolari starter nel caso in cui questo latte venga trasformato in prodotti che richiedono una sua acidificazione.

Se da una parte la refrigerazione, rappresenta un mezzo per prolungare la vita conservativa del prodotto, dall'altro può presentare una nuova ed importante fonte di contaminazione quando l'igiene non sia rispettata.

Il raffrescamento del latte alla stalla, pur permettendo un prolungamento della vita conservativa del prodotto di 24-48 ore, non rimpiazza una cattiva igiene di produzione anche se alla prova della reduttasi del blu di metilene può sembrare il contrario. Questa prova, infatti, non è applicabile con latti refrigerati (Tiecco, 2000).

Il latte raffrescato a temperature al di sotto dei 10°C presenta, inoltre, l'inconveniente d'inibire lo sviluppo dei batteri lattici, permettendo, invece, quello degli psicrotrofi, gruppo questo che comprende specie proteolitiche e lipolitiche, che danneggiano la qualità del prodotto. In particolare è il gruppo degli *Pseudomonas* acromogeni che prende il sopravvento; tuttavia va ricordato che anche altri psicrotrofi (*Acinetobacter*; *Alcaligenes*, alcuni *Bacillus* e *Clostridium*, *Flavobacterium*) e possono moltiplicarsi a temperature comprese tra 3-7° C.

Questi microorganismi psicrotrofi molto spesso producono delle proteasi e lipasi resistenti ai trattamenti termici successivi, richiedendo alcune addirittura trattamenti a 150° C per 10" per la loro inattivazione.

Gli psicrofili sono germi dotati di intense attività biochimiche; per circa il 90% sono proteolitici o lipolitici e nel 60% dei casi mostrano contemporaneamente i due caratteri. I loro enzimi sono di regola termostabili per cui rimangono, e sono attivi, anche nel latte pastorizzato.

Le proteasi daranno origine ad un sapore di amaro e le lipasi a rancidità anche nei latti trattati termicamente (Tiecco, 2000).

Il tempo di duplicazione degli psicrotrofi aumenta rapidamente quando la temperatura si abbassa

sotto i 10°C; a 4°C tale tempo di duplicazione è circa di 8 ore, mentre a 1°C è di 18 ore o più. Un latte di buona qualità che ha una carica di 10.000 UFC/ml, conservato a 1°C, può raggiungere una carica di circa 160.000 UFC/ml dopo 3 giorni di conservazione, carica questa che non incide minimamente sulla qualità del prodotto.

Dal punto di vista microbiologico tuttavia c'è da dire subito che i vantaggi si notano soprattutto nei casi in cui la cariche microbiche siano già modeste nel prodotto; infatti è stato dimostrato che il tasso di moltiplicazione è in funzione del grado di contaminazione iniziale, oltre, s'intende, alla temperatura di conservazione ed al tempo. Non tutti i microorganismi vengono inibiti nella loro crescita quando il latte viene conservato in frigo; gli psicrofili, infatti, sono in grado di riprodursi con una velocità che è in diretto rapporto con la specie microbica. Nel latte la percentuale degli psicrofili varia dal 3% al 90% a seconda delle condizioni igieniche dell'ambiente, della mungitura, ecc... Più il numero di questi germi è alto, più le cariche microbiche al momento della lavorazione del prodotto saranno elevate.

Trascorso tale periodo, la cui durata è influenzata da veri fattori fra i quali predomina la temperatura di conservazione, si verifica un aumento dei microorganismi che, se non s'interviene, daranno origine a una serie di modificazioni chimico-fisiche del prodotto stesso (Tiecco, 2000).

Il trasporto del latte dai centri di produzione a quelli di raccolta, quando effettuato in condizioni inidonee (recipienti seminuovi, su mezzi che provocano violenti sbattimenti, in cisterne o bidoni non refrigeranti, ecc...), può risultare particolarmente dannoso in quanto,, determinando la modificazione di alcune costanti del latte, viene a creare un ambiente particolarmente idoneo per lo sviluppo microbico, che può raggiungere cariche elevate. Nello stesso tempo i bidoni e le cisterne possono, per cattiva pulizia, rappresentare ulteriori fonti di contaminazione.

Durante il trasporto, per effetto appunto dello scuotimento, si assiste infatti a modificazioni notevoli della composizione, in gas del latte; si osserva una costante riduzione, più o meno cospicua della CO₂, con conseguente spostamento dei valori del pH. È noto infatti che la CO₂, in coppia col bicarbonato, rappresenta uno dei sistemi tampone presenti nel latte e che ne fissano il pH su valori di 6,5-6,7. Sono stati descritti casi in cui le perdite di CO₂ hanno raggiunto valori pari al 45-46% con notevole scadimento delle attitudini difensive del prodotto.

Oltre alla perdita di CO₂ durante il trasporto si assiste ad un arricchimento in O₂ libero, con conseguente spostamento del potenziale di ossido-riduzione a favore della frazione ossidante; ciò genera la distruzione della vitamina C e la comparsa del sapore ossidato in seguito all'alterazione dei grassi. Questi due fenomeni sono catalizzati dalla presenza di ioni rame e ferro. L'arricchimento in O₂, creando un ambiente aerobico, favorisce lo sviluppo dei batteri presenti nel latte con conseguente aumento delle cariche microbiche, fino a raggiungere in molti casi svariati milioni di

germi/ml. Questi latti così fortemente ossigenati si prestano poco alla lavorazione di certi formaggi presentando una coagulazione lenta e una cagliata friabile e spugnosa con conseguente modesta separazione del siero. Le ragioni di tali difetti di caseificazione risiedono nel fatto che lo scuotimento influenza negativamente la componente colloidale (distruggendo le grosse molecole di caseinato) e l'emulsoide lipidico (facendo perdere ai globuli di grasso l'attitudine a conglutinarsi); aumenta la tensione superficiale e riduce la viscosità: rompe gli ammassi microbici favorendone così lo sviluppo (Tiecco, 2000).

In genere si può dire che i microorganismi psicotrofi presenti nel latte sono sempre indesiderabili perché:

- a) compromettono in maniera grave i processi di lavorazione rendendoli in alcuni casi addirittura impossibili;
- b) il loro sviluppo non viene inibito dalla refrigerazione;
- c) alcune specie possono sopportare certi trattamenti termici;
- d) alcalinizzano il latte.

Viceversa le specie acidificanti risultano sempre utili perché:

- a) sono indispensabili per certe lavorazioni industriali o comunque non le danneggiano;
- b) vengono inibite dalla refrigerazione e pertanto sono controllabili;
- c) con i trattamenti termici vengono eliminate, ad eccezione, di certe specie termoduriche;
- d) acidificando il latte ostacolando lo sviluppo dei germi nocivi (Tiecco, 2000).

Tab 13. Specie di batteri Gram-negativi isolati dal latte crudo in allevamenti del South Dakota e western Minnesota (Jayarao *et al.*, 1999).

| | Specie batteriche | Totali (n = 201) | Percentuale di totali isolati |
|---------------|---|------------------------|-------------------------------|
| N° | | | |
| Coliformi | | 74 (36,8) ³ | 100 |
| 1 | <i>Citrobacter freundii</i> | 6 (3,0) | 8,1 |
| 2 | <i>Enterobacter agglomerans</i> | 9 (4,5) | 12,2 |
| 3 | <i>Enterobacter cloacae</i> | 14 (7,0) | 18,9 |
| 4 | <i>Enterobacter sakazakii</i> | 1 (0,5) | 1,4 |
| 5 | <i>Escherichia coli</i> | 17 (8,5) | 23 |
| 6 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 7 (3,0) | 9,5 |
| 7 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 20 (10,0) | 27 |
| Non coliformi | | 127 (63,2) | 100 |
| 8 | <i>Acinetobacter lwoffii</i> | 2 (1,0) | 1,6 |
| 9 | <i>Aeromonas salmonicida</i> <i>ssp. salmonicida</i> | 1 (0,5) | 0,8 |
| 10 | <i>Aeromonas schubertii</i> | 1 (0,5) | 0,8 |
| 11 | <i>Agrobacterium radiobacter</i> | 1 (0,5) | 0,8 |
| 12 | <i>Comamonas testosteroni</i> | 3 (1,5) | 2,4 |
| 13 | <i>Hafnia alvei</i> | 11 (5,5) | 8,7 |
| 14 | <i>Listonella damsela</i> | 3 (1,5) | 2,4 |
| 15 | <i>Moraxella lacunata</i> | 1 (0,5) | 0,8 |
| 16 | <i>Ochrobactrum anthropi</i> | 1 (0,5) | 0,8 |
| 17 | <i>Oligella urethralis</i> | 1 (0,5) | 0,8 |
| 18 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4 (2,0) | 3,1 |

| | | | |
|----|--------------------------------|-----------|------|
| 19 | <i>Pseudomonas cepacia</i> | 2 (1,0) | 1,6 |
| 20 | <i>Pseudomonas diminuta</i> | 1 (0,5) | 0,8 |
| 21 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 60 (29,9) | 47,2 |
| 22 | <i>Pseudomonas mendocina</i> | 2 (1,0) | 1,6 |
| 23 | <i>Pseudomonas maltophilia</i> | 1 (0,5) | 0,8 |
| 24 | <i>Pseudomonas pickettii</i> | 1 (0,5) | 0,8 |
| 25 | <i>Pseudomonas putida</i> | 24 (11,9) | 18,9 |
| 26 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> | 3 (1,5) | 2,4 |
| 27 | <i>Xanthomonas maltophilia</i> | 3 (1,5) | 2,4 |
| 28 | <i>Yersinia enterocolitica</i> | 1 (0,5) | 0,8 |

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1 MATERIALI E METODI

3.1.1 OBIETTIVO DELLA TESI

L'obiettivo della mia tesi era quello di ottenere dati attuali sulla prevalenza in Italia di portatori asintomatici di *Pseudomonas fluorescens* nell'intestino di vacche da latte. Lo scopo era di capire se questi animali potessero essere dei potenziali diffusori di *Pseudomonas fluorescens* nel latte crudo e quale ruolo potessero giocare le lattifere nella trasmissione del batterio lungo la filiera alimentare "latte" fino ai formaggi.

Ad oggi, la bibliografia riporta pochi studi che confermino la prevalenza di *Pseudomonas fluorescens* nell'intestino delle vacche da latte e non si conosce ancora bene il ruolo e la prevalenza dei portatori soprattutto nell'allevamento e nel macello. Inoltre *Pseudomonas fluorescens* può essere fonte di contaminazione diretta per il latte, e da lì discendere poi lungo la fasi produttive dei formaggi.

Pseudomonas fluorescens viene confermata come causa di alterazione di colore e di odore nelle carni, ma vari studi hanno dimostrato che *Pseudomonas spp.* possono produrre nel latte e nei suoi prodotti derivati la comparsa di sapore amaro, di odori atipici e di rancido (Wiedmann *et al.*, 2000; Doyle *et al.*, 2001; Dogan et Boor, 2003; Giaccone, 2010). Alcuni ceppi, tra cui *Pseudomonas fluorescens*, possono produrre pigmenti fluorescenti e/o colorati che possono conferire all'alimento colorazioni innaturali (giallo, rosso, verde, fluorescente o blu-viola).

3.1.2 MATERIALI

La ricerca è stata condotta in due macelli riconosciuti CE e in due allevamenti di vacche da latte. Più precisamente, nei macelli è stato effettuato il prelevamento del contenuto intestinale direttamente dal retto di vacche da latte, vitelli (198-242 giorni), vitelloni/bovini adulti (410-708 giorni), regolarmente macellati e provenienti da diverse aziende. Negli allevamenti invece è stato prelevato il materiale fecale attraverso l'esplorazione rettale di vacche da latte.

I campioni sono stati sottoposti ad analisi per la ricerca di *Pseudomonas spp.* e *Pseudomonas fluorescens*. Ad oggi non ci sono elementi per prevedere un programma di campionamento di routine per la ricerca di *Pseudomonas spp.* da parte della Sanità Pubblica. Trattandosi di una problematica di prevalente interesse produttivo, essa deve essere gestita dalla ditta nel proprio piano di autocontrollo. Pertanto potrebbe essere utile ricorrere, per la valutazione dell'accettabilità della partita, a piani di campionamento del Latte e dei prodotti a base di latte come previsto dalla ISO/TS 11059:2009 (Marro *et al.*, 2011).

La mia indagine, però, si è basata sull'analisi qualitativa, e non quantitativa, delle *Pseudomonas spp.* ed in particolare di *Pseudomonas fluorescens* dal contenuto intestinale delle vacche.

In totale sono stati sottoposti al controllo 676 capi divisi per categorie:

- Vacche: 628
- Vitelloni: 42
- Vitelli: 6

I macelli presi in considerazione costituiscono un osservatorio epidemiologico per questo tipo di indagini, dato che in uno (quello di Vicenza) sono destinati i bovini allevati un po' dal tutto il vicentino; mentre nell'altro vengono convogliati i bovini della bassa padovana.

Gli allevamenti ci permettono di analizzare e di confrontare capi della regione della Lombardia nel Nord Italia.

Il prelievo del contenuto intestinale è stato effettuato direttamente dal retto di ciascun animale, con uso di materiale sterile per il prelievo. Per ogni capo si prelevavano circa 250 g di feci.

La raccolta dei campioni di contenuto intestinale di bovini si è svolta da febbraio 2012 a ottobre 2012 per un periodo di 8 mesi

3.1.3 METODI

I campioni sono stati registrati per categoria, provenienza, data di macellazione.

La ricerca si è basata sulla seguente metodica qualitativa:

➤ Fase di arricchimento : 25 g di campione sono stati dispersi in 225 ml di *acqua peptonata*, e posti in un contenitore sterile, opportunamente siglato con il numero del campione.

Nello specifico, i vari terreni e brodi sono stati ottenuti nel seguente modo:

1 Acqua peptonata: sospendere 10 g di peptone da caseina e 8 g di NaCl in 1 litro di acqua distillata. Autoclavare per 15 minuti ad una temperatura di 121°C.

2 GSP agar: sospendere 45 grammi di polvere in 1 litro di acqua distillata, scaldare fino alla completa dissoluzione. Sterilizzare in autoclave per 15 minuti ad una temperatura di 121 °C. Lasciare raffreddare a 50°C ed aggiungere 0.070 grammi di penicillina G. Miscelare bene e sotto cappa preparare le piastre con circa 15 ml di terreno per piastra.

Tab 14. Condizioni di preparazione e d'incubazione dei terreni per l'isolamento di *Pseudomonas spp.*

| Terreno | Preparazione | Autoclave | Raffreddamento | Supplemento |
|------------------------|---|------------------------|-----------------------|----------------------------|
| Acqua peptonata | 10g di peptone di caseina + 8g di NaCl + 1lt acqua distillata | 121°C per 15 minuti | - | - |
| GSP agar | 45g di polvere + 1lt di acqua distillata + scaldare fino a completa dissoluzione | 121°C per 15 minuti | 50°C | 0,070g di penicillina G |

Tab 15. Fasi per l'identificazione di *Pseudomonas spp.*

| FASI | I ^a | II ^a | III ^a | IV ^a | V ^a | VI ^a |
|------|---|---|---|--|---|--|
| | 25g di feci + 225ml di acqua peptonata in un contenitore sterile siglato con il numero del campione, messo a incubare per 24 ore a 25-27°C. | Dalla brodocoltura con l'utilizzo di un'ansa sterile si effettua la semina qualitativa sul terreno GSP. | Le piastre seminate vengono poste ad incubare per 48 ore a 25-27°C. | Le colonie vengono sottoposte alla rivelazione della fluorescenza attraverso l'utilizzo della lampada di Wood. Le colonie che hanno mostrato la fluorescenza vengono riseminate sul terreno GSP. | Le colonie riseminate vengono ulteriormente sottoposte alla lampada di Wood, e se fluorescenti, successivamente vengono sottoposte al test dell'ossidasi. | Le colonie sospette vengono sottoposte alla colorazione di Gram: <i>Pseudomonas</i> è un microorganismo Gram negativo, si colora quindi di rosa. |

➤ Dopo 24 ore d'incubazione a 25-27°C, dalla brodocoltura di arricchimento e con l'utilizzo di un'ansa sterile è stata effettuata la semina qualitativa su un terreno di base per l'isolamento di *Pseudomonas spp.*, selettivo e differenziale chiamato *GSP Agar selettivo pseudomonas-aeromonas secondo KIELWEIN (base)* per microbiologia. Questo terreno utilizza come nutrienti unici il glutammato e amido, composti che molti microorganismi non riescono a metabolizzare (Stranier *et al.* 1966). L'amido è degradato da *Aeromonas spp.* con la produzione di acido causando il viraggio del terreno dal rosso al giallo, ma questa reazione enzimatica non avviene per *Pseudomonas spp.* Nel *Gsp agar* viene utilizzato un inibitore selettivo, la *penicillina G* per incrementare la sua selettività.

➤ Le piastre così ottenute, sono state poste ad incubare per 48 ore ad una temperatura di 25-27°C.

➤ Le colonie sono state sottoposte alla rilevazione della fluorescenza attraverso l'utilizzo della lampada di Wood. Le colonie che hanno mostrato la fluorescenza sono state riseminate in *GSP agar* e successivamente sottoposte al test dell'ossidasi. La ricerca dell'ossidasi è un test che permette d'identificare i microrganismi aerobi ed è utilizzata per evidenziare la presenza della citocromo c-

ossidasi, che permette il trasporto degli elettroni all'ossigeno (fosforilazione ossidativa). *Pseudomonas fluorescens* è ossidasi positiva. Le colonie sospette sono state sottoposte a identificazione in base alle caratteristiche morfologiche e tintoriali mediante colorazione di Gram: *Pseudomonas* è un microrganismo Gram negativo, si colora quindi di rosa.



Fig 25 – *Pseudomonas* spp. cresciute sulla superficie del terreno GSP.

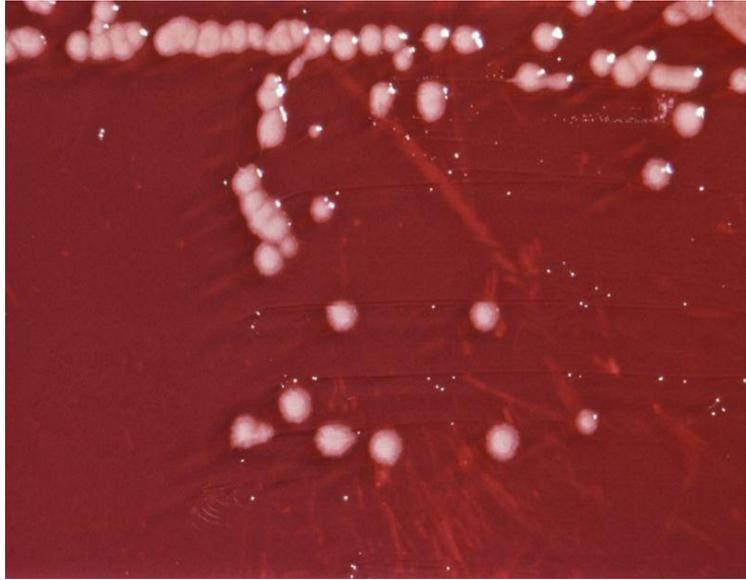


Fig 26 – Ingrandimento di *Pseudomonas* spp. cresciute sulla superficie del terreno GSP.

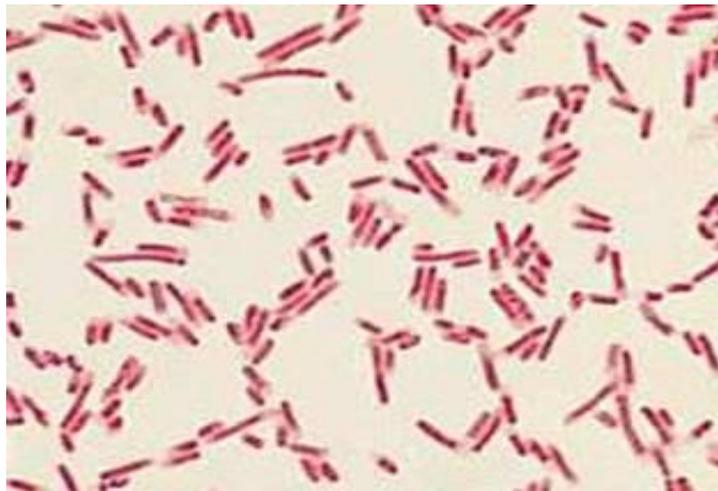


Fig 27– *Pseudomonas* spp. colorazione di GRAM.



Fig 28– *Aeromonas* spp. cresciute sulla superficie del terreno GSP.



Fig 29 – Ingrandimento di *Aeromonas* spp. cresciute sulla superficie del terreno GSP.

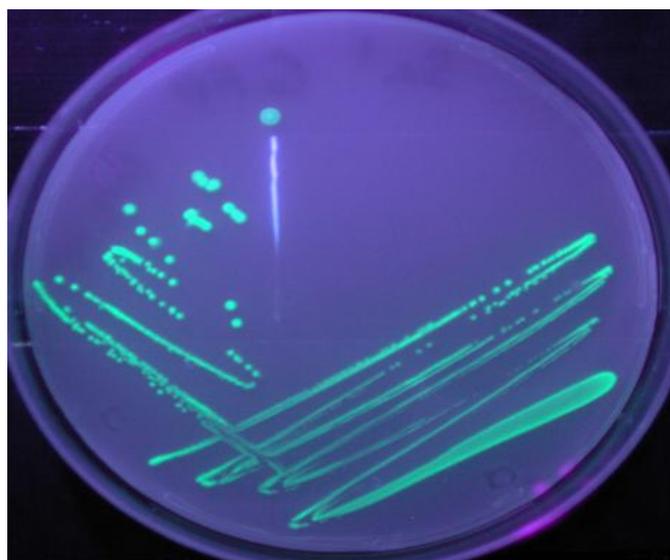


Fig 30 – Esempio di fluorescenza evidenziata con lampada di *Wood*.

➤ L'identificazione biochimica è stata effettuata mediante gallerie API 20 NE (BIOMÉRIEUX). Queste gallerie sono costituite da 20 microprovette contenenti substrati disidratati, per la ricerca delle attività enzimatiche e fermentative degli zuccheri. La reazione prodotta durante l'incubazione si traduce in viraggio cromatico spontaneo, o rilevato dopo aggiunta di reattivi ausiliari.

1 Identificazione biochimica: API 20 NE è un sistema standardizzato, per l'identificazione di bacilli Gram-negativi, non esigenti, non enterici (per es. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, ecc.) che utilizza 8 test convenzionali e 12 test di assimilazione ed una base dei dati.

- Servendosi di un'ansa si prelevano da una a quattro colonie batteriche dal terreno, e si sospende all'interno di una fiala API NaCl 0,85%, fino ad ottenere una sospensione di torbidità equivalente ad 0,5 della scala di *McFarland*.

- Si passa all'inoculo della galleria, distribuendo la sospensione batterica nelle prime 8 microprovette evitando la formazione di bolle. Importanti sono la quantità e la qualità di riempimento di ciascuna microprovetta.
- Si prepara un secondo inoculo servendosi di 200 µl della prima sospensione e inoculando una fiala di API AUX Medium. Con quest'ultima si riempiono le restanti gallerie.
- Porre ad incubare il tutto a 29 ± 2 °C.
- Dopo 24 ore si fa la prima lettura della galleria. La lettura avviene tramite un viraggio di colore (fig. 31) e la corrispondente positività o negatività si evidenzia in una tabella. La tabella 16 indica le modalità di lettura del biochimico suddetto. Le positività si segnano con un (+), mentre le negatività con un (-), nel corrispettivo profilo numerico. Dopo di che si sommano solo le positività, esempio fig. 31 e 32.



Fig 31 – Esempio di Test Biochimico Api 20 NE.



Fig 32 – Esempio di Test Biochimico Api 20 NE.

Tab 16. Tabella di Lettura.

| TESTS | SUBSTRATI | QUANTIT A' (mg/cup.) | REAZIONI/ ENZIMI | RISULTATO NEGATIVO | RISULTATO POSITIVO |
|-----------------|---|----------------------------|--|--|---|
| NO ₃ | Nitrato di Potassio | 1,36 | Riduzione dei nitrati in nitriti | <u>NIT 1+NIT 2 /5 min</u> incolore | <u>NIT 1+NIT 2 /5 min</u> rosa-rosso |
| NO ₃ | Nitrato di Potassio | 1,36 | Riduzione dei nitrati in nitriti | <u>Zn/5 min</u> rosa | <u>Zn/5 min</u> incolore |
| TRP | L-triptofano | 0,2 | Produzione di indolo (TRiptofano) | <u>JAMES/ immediato</u> incolore verde chiaro/ giallo | <u>JAMES/ immediato</u> rosa |
| <u>GLU</u> | D-glucosio | 1,92 | fermentazione (GLUcosio) | Da blu a verde | giallo |
| <u>ADH</u> | L-arginina | 1,92 | Arginina Deidrolasi | giallo | Arancione/ rosa/ rosso |
| <u>URE</u> | Urea | 0,76 | UREasi | giallo | Grigio/ marrone/ nero |
| ESC | esculina citrato ferrino | 0,56 0,072 | idrolisi (β-glucosidasi) (ESCulina) | giallo | grigio/ marrone/nero |
| GEL | gelatina (origine bovina) | 0,6 | Idrolisi (proteasi) (GELatina) | nessuna diffusione del pigmento | diffusione del pigmento nero |
| PNPG | 4-nitorfenil-βD-galattopiranoside - galattopiranoside | 0,22 | β-galattosidasi (Para-NitroFenil-βD-Galattopiranosidasi) | incolore | giallo |
| <u>(GLU)</u> | D-glucosio | 1,56 | assimilazione (GLUcosio) | trasparente | torbido |
| <u>(ARA)</u> | L-arabinosio | 1,4 | assimilazione (ARABinosio) | trasparente | torbido |
| <u>(MNE)</u> | D-mannosio | 1,4 | assimilazione (ManNosio) | trasparente | torbido |
| <u>(MAN)</u> | D-mannitolo | 1,36 | assimilazione (MANnitolo) | trasparente | torbido |
| <u>(NAG)</u> | N-acetil-glucosamina | 1,28 | assimilazione (N-Acetil-Glucosamina) | trasparente | torbido |

| | | | | | |
|--------------|---|------|---|---|---|
| <u>(MAL)</u> | D-maltosio | 1,4 | assimilazione (MALtosio) | trasparente | torbido |
| <u>(GNT)</u> | potassio gluconato | 1,84 | assimilazione (GlucoNaTo di potassio) | trasparente | torbido |
| <u>(CAP)</u> | Acido caprico | 0,76 | assimilazione (acido CAPrico) | trasparente | torbido |
| <u>(ADI)</u> | Acido adipico | 1,12 | assimilazione (acido ADIpico) | trasparente | torbido |
| <u>(MLT)</u> | Acido malico | 1,56 | assimilazione (MaLaTo) | trasparente | torbido |
| <u>(CIT)</u> | Citrato trisodico | 2,28 | assimilazione (CITrato trisodico) | trasparente | torbido |
| <u>(PAC)</u> | Acido fenilacetico | 0,8 | assimilazione (acido FenilACetico) | trasparente | torbido |
| <u>(OX)</u> | (vedere scheda tecnica del test ossidasi) | - | citocromo ossidasi | (vedere scheda tecnica del test ossidasi) | (vedere scheda tecnica del test ossidasi) |

- Dopo 48 ore di incubazione si procede con la seconda ed ultima lettura.

Esempio: nel caso della microprovetta ESC, in cui avviene l'idrolisi dell'esculina, se il colore è giallo chiaro il risultato è positivo (+), in caso di colorazione nera il risultato è negativo (-).

L'identificazione avviene tramite un profilo numerico (fig.33)

Le positività si segnano con un (+), mentre le negatività con un (-), nel corrispettivo profilo numerico. Dopo di che si sommano solo le positività, esempio fig. 34.

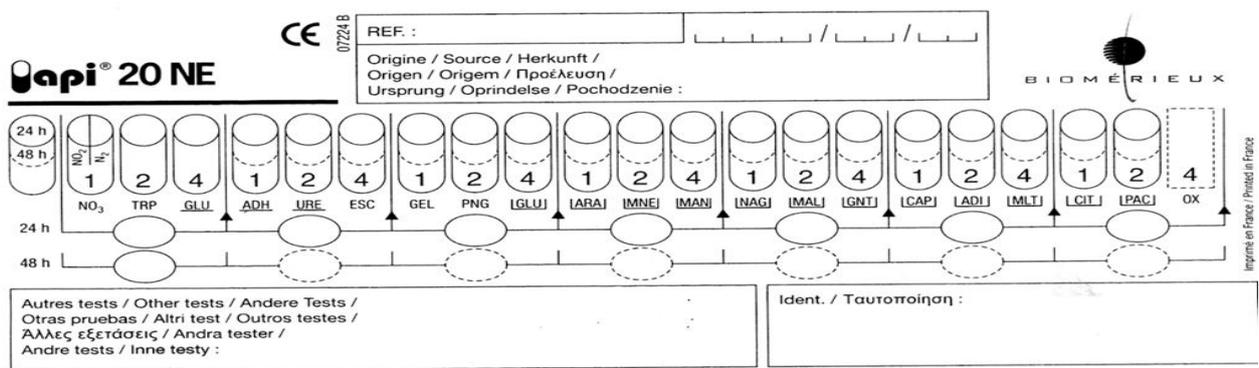


Fig 33 – Profilo numerico del test Biochimico Api 20 NE.

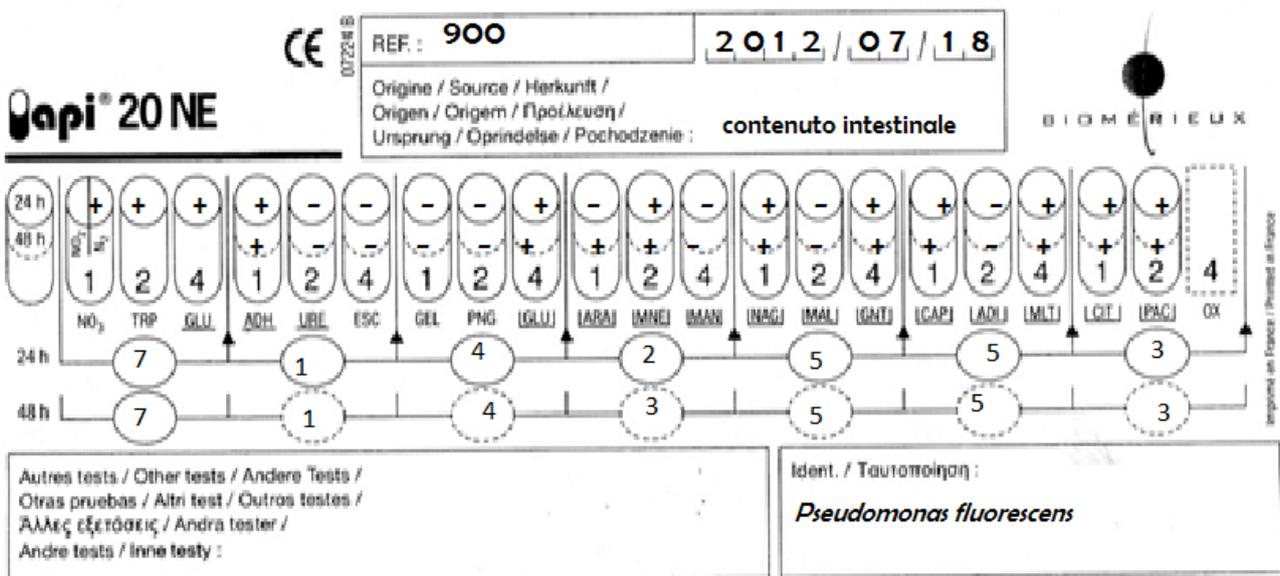


Fig 34 – Esempio Profilo numerico del test Biochimico Api 20 NE dopo lettura.

3.2 RISULTATI

| NUMERO COMPLESSIVO DEGLI ANIMALI TESTATI SUDDIVISI PER CATEGORIA | |
|--|-----|
| Numero complessivo di animali testati | 676 |
| vacche testate | 628 |
| vitelloni testati | 42 |
| vitelli | 6 |

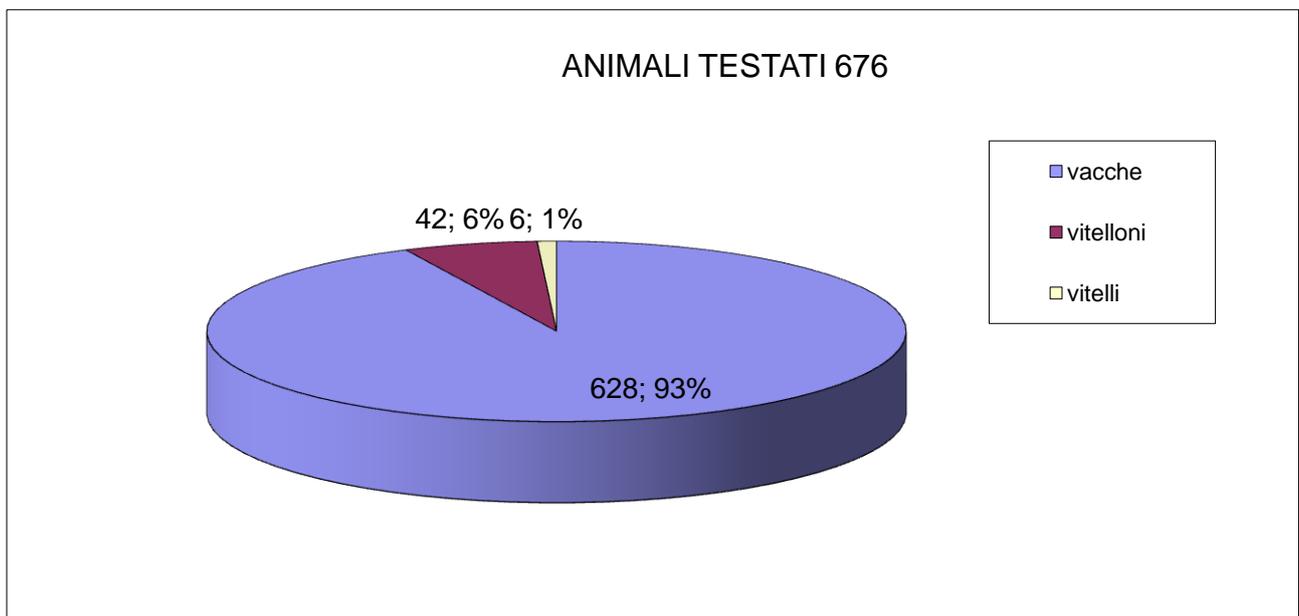


Grafico n°1

| NUMERO COMPLESSIVO DELLE VACCHE SUDDIVISE PER PROVENIENZA | |
|--|------------|
| Numero totale delle vacche | 628 |
| testate a macello | 464 |
| prelievo effettuato in allevamento | 164 |

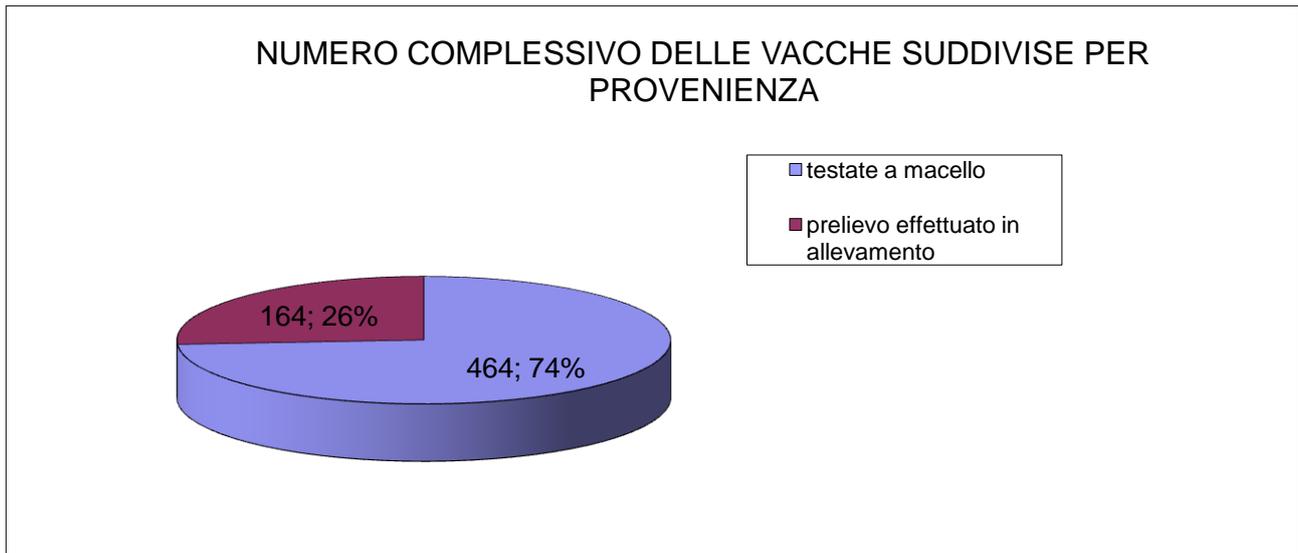


Grafico n°2

| NUMERO TOTALE DEGLI ANIMALI POSITIVI PER <i>Pseudomonas spp.</i> DIVISI PER CATEGORIE | 656 |
|---|-----|
| VACCHE | 615 |
| VITELLI | 4 |
| VITELLONI | 37 |

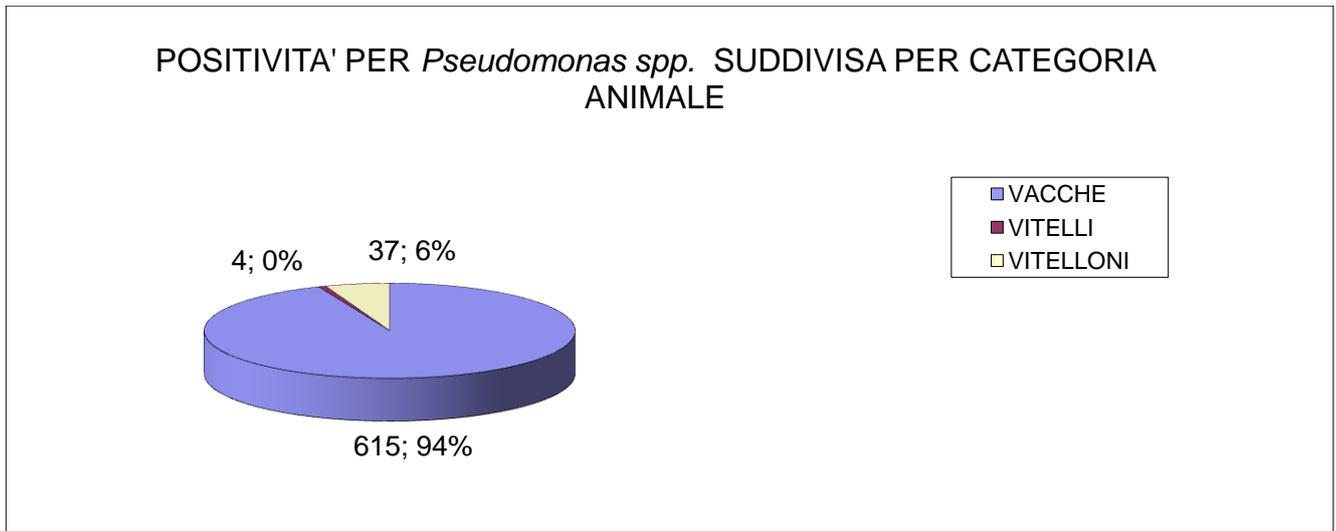


Grafico n°3

| CONFRONTO TRA IL TOTALE DEGLI ANIMALI POSITIVI E QUELLI NEGATIVI PER <i>Pseudomonas spp.</i> | |
|--|-----|
| ANIMALI POSITIVI | 656 |
| ANIMALI NEGATIVI | 20 |

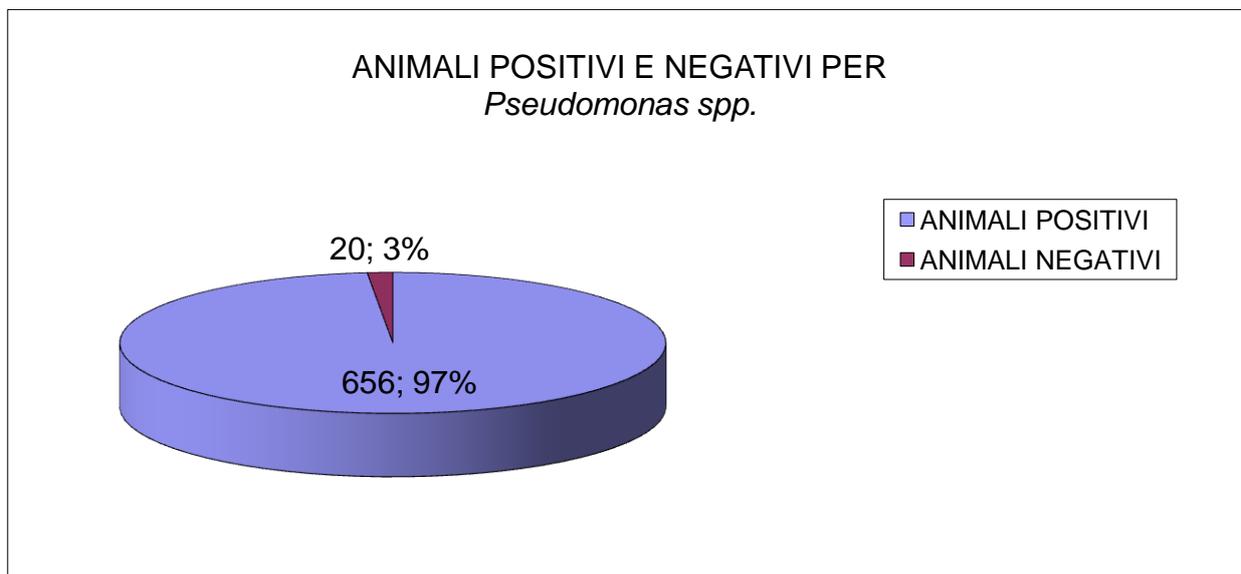


Grafico n°4

| CONFRONTO TRA IL TOTALE DELLE VACCHE POSITIVE E NEGATIVE PER <i>Pseudomonas spp.</i> : PRELIEVI A MACELLO | |
|--|-----|
| VACCHE POSITIVE | 451 |
| VACCHE NEGATIVE | 13 |

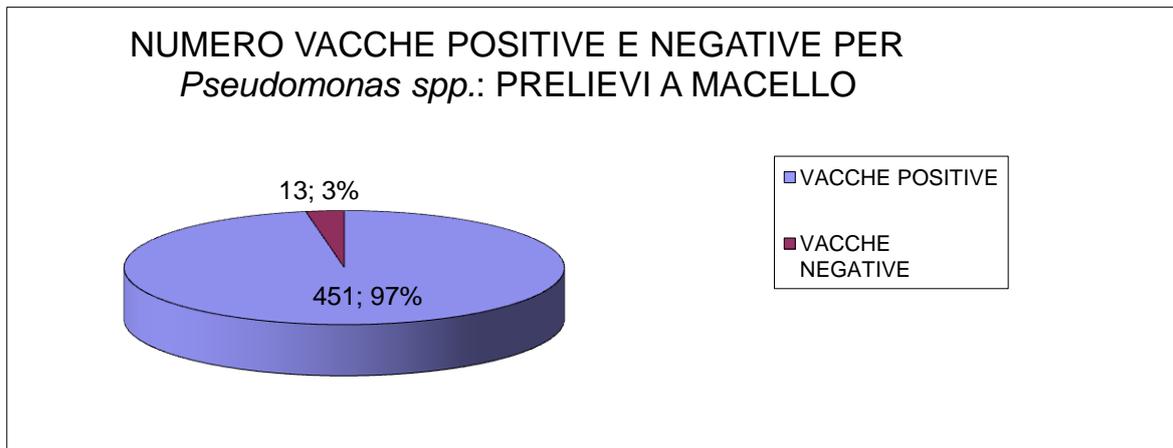


Grafico n°5

| CONFRONTO TRA IL TOTALE DELLE VACCHE POSITIVE E NEGATIVE PER <i>Pseudomonas spp.</i> : PRELIEVI IN ALLEVAMENTO | |
|--|-----|
| VACCHE POSITIVE | 164 |
| VACCHE NEGATIVE | 0 |

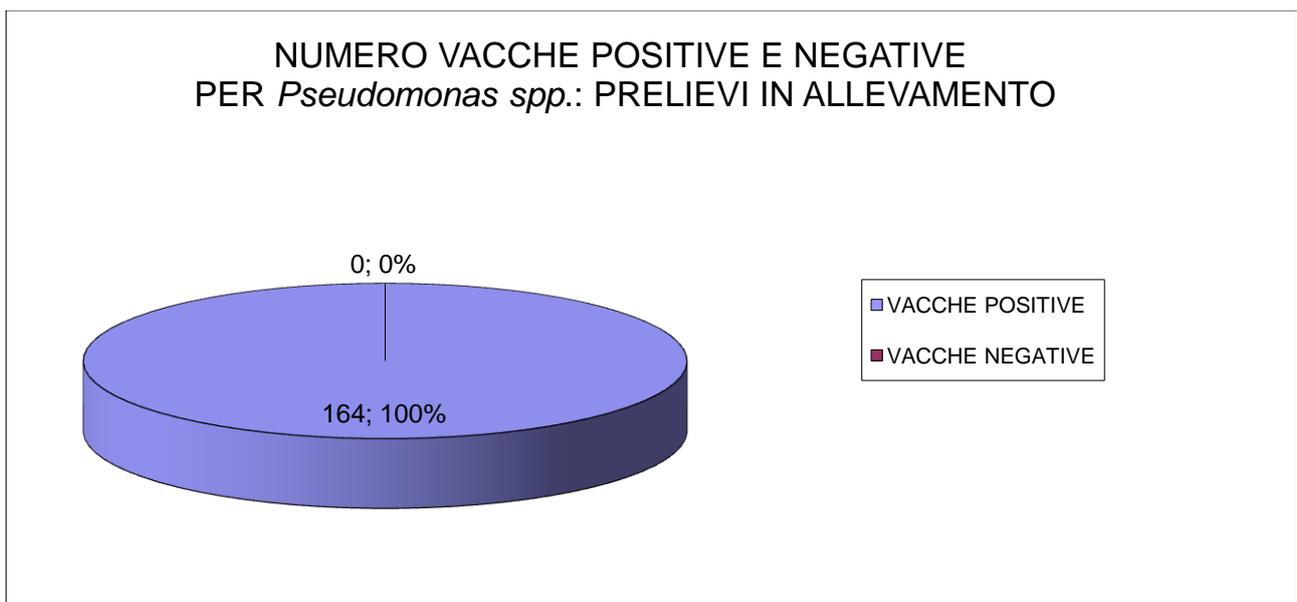


Grafico n°6

| NUMERO TOTALE VACCHE POSITIVE PER <i>Pseudomonas spp.</i> | |
|---|-----|
| VACCHE DA MACELLI | 451 |
| VACCHE DA ALLEVAMENTI | 164 |

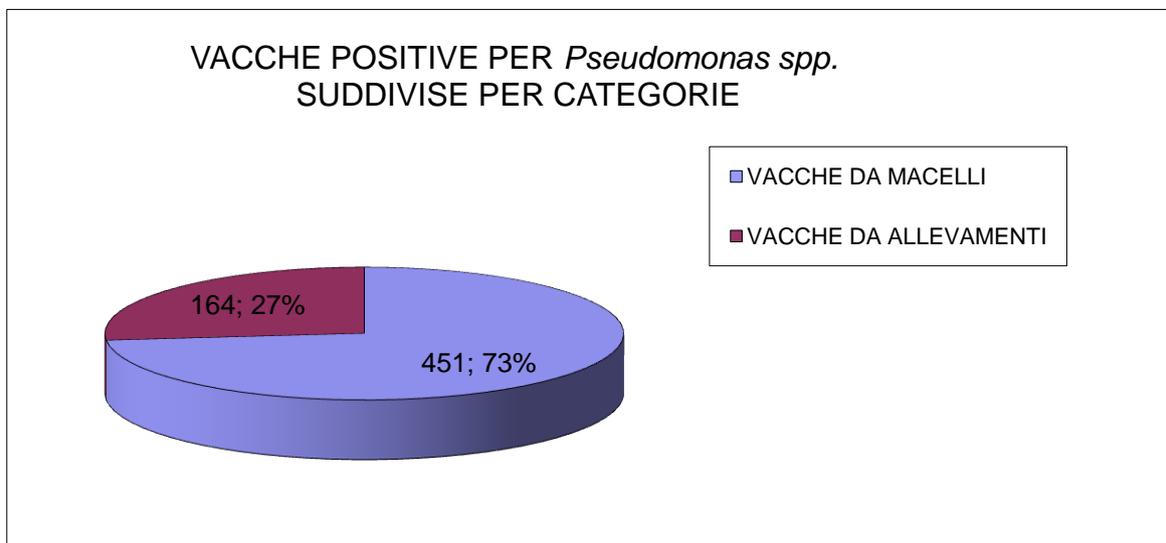


Grafico n°7

| NUMERO TOTALE DEGLI ANIMALI POSITIVI PER <i>Aeromonas spp.</i> DIVISI PER CATEGORIE | |
|---|-----|
| VACCHE | 345 |
| VITELLI | 5 |
| VITELLONI | 38 |

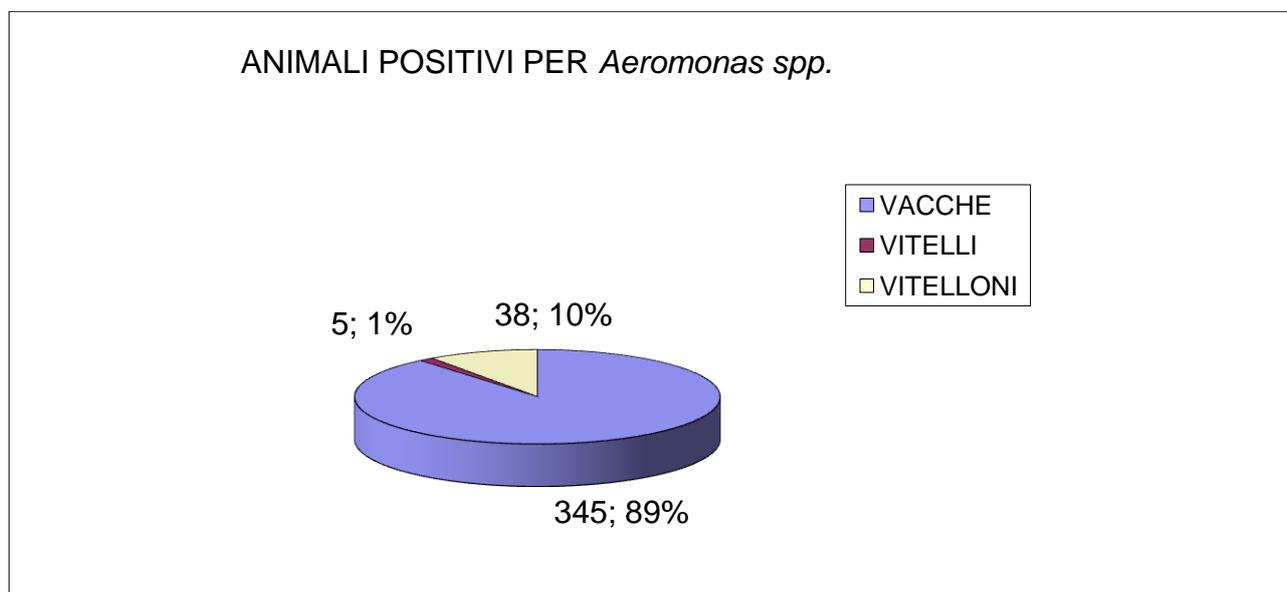


Grafico n°8

| CONFRONTO TRA IL TOTALE DEGLI ANIMALI POSITIVI E QUELLI NEGATIVI PER <i>Aeromonas spp.</i> | |
|---|-----|
| ANIMALI POSITIVI | 388 |
| ANIMALI NEGATIVI | 288 |

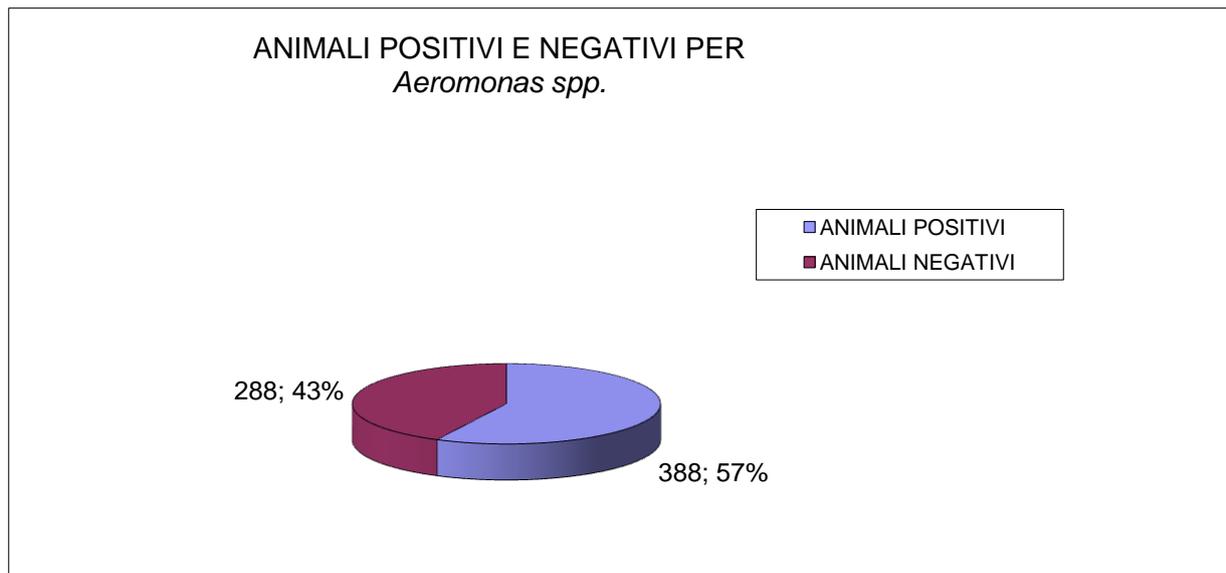


Grafico n°9

| NUMERO TOTALE VACCHE POSITIVE PER <i>Aeromonas spp.</i> | |
|---|-----|
| VACCHE DA MACELLO | 330 |
| VACCHE DA ALLEVAMENTO | 15 |

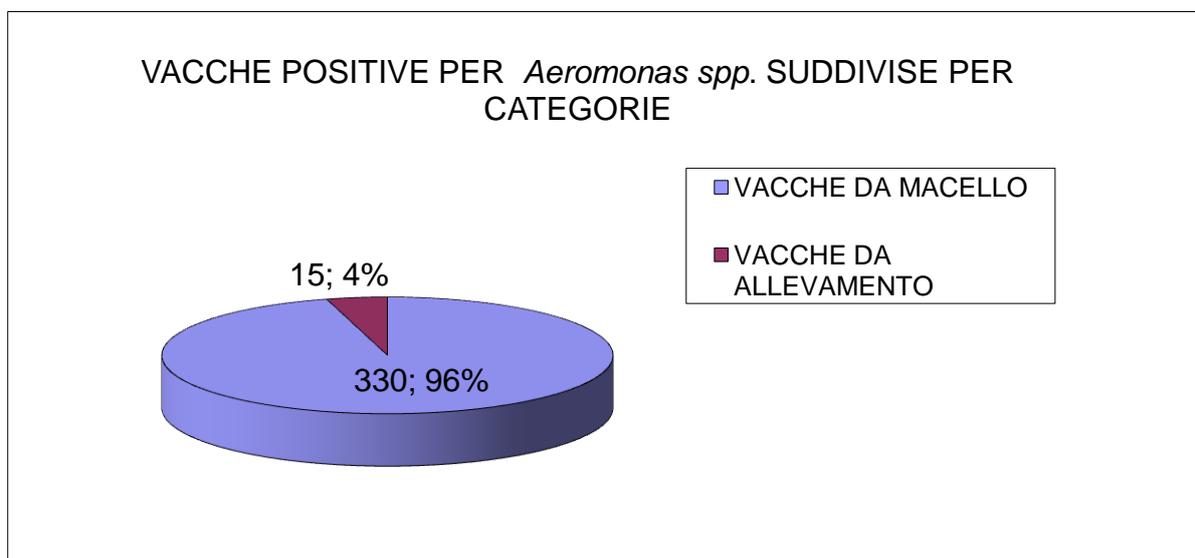


Grafico n°10

| NUMERO TOTALE VACCHE DI ALLEVAMENTO POSITIVE PER <i>Aeromonas spp.</i> | |
|--|-----|
| VACCHE POSITIVE | 15 |
| VACCHE NEGATIVE | 149 |

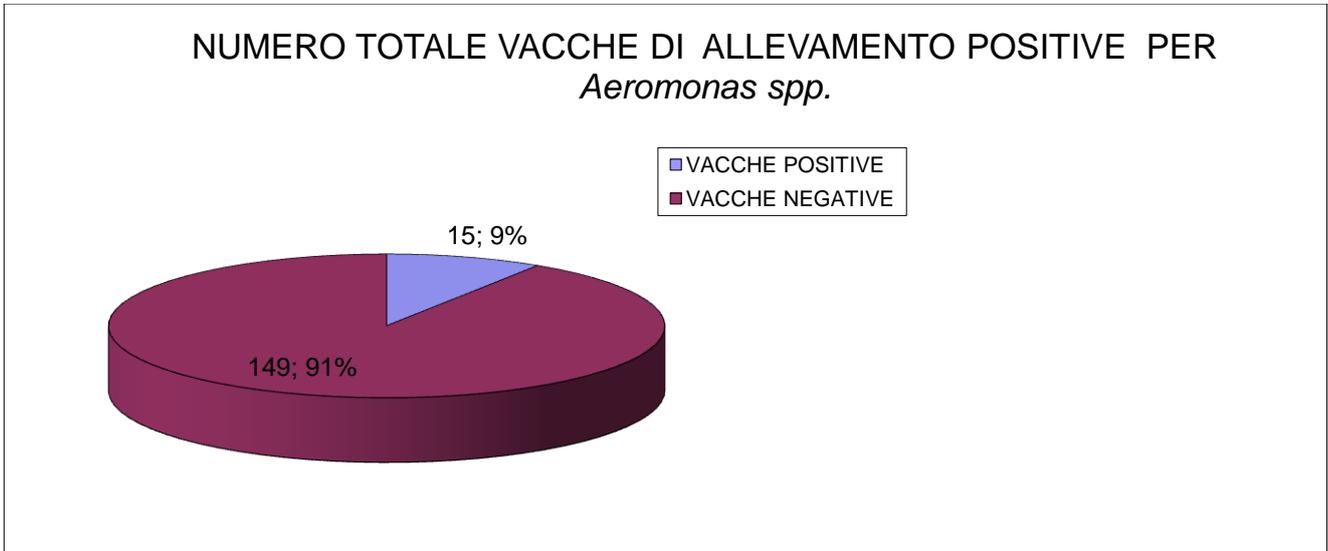


Grafico n°11

| NUMERO TOTALE VACCHE DEI MACELLI POSITIVE PER <i>Aeromonas spp.</i> | |
|---|-----|
| VACCHE POSITIVE | 330 |
| VACCHE NEGATIVE | 134 |

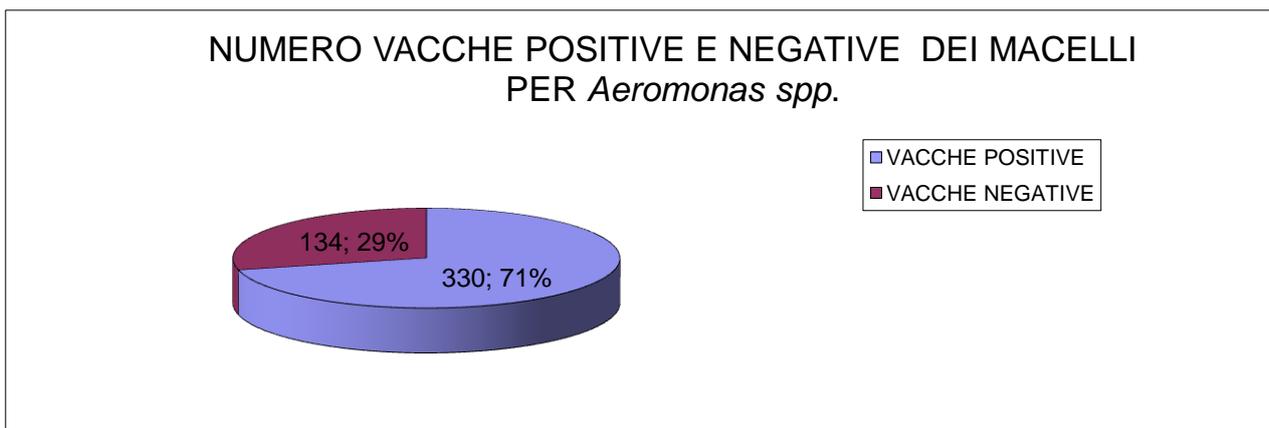


Grafico n°12

| NUMERO TOTALE <i>Pseudomonas fluorescens</i> | |
|---|------------|
| Numero animali positivi | 8 |
| Numero animali negativi | 668 |

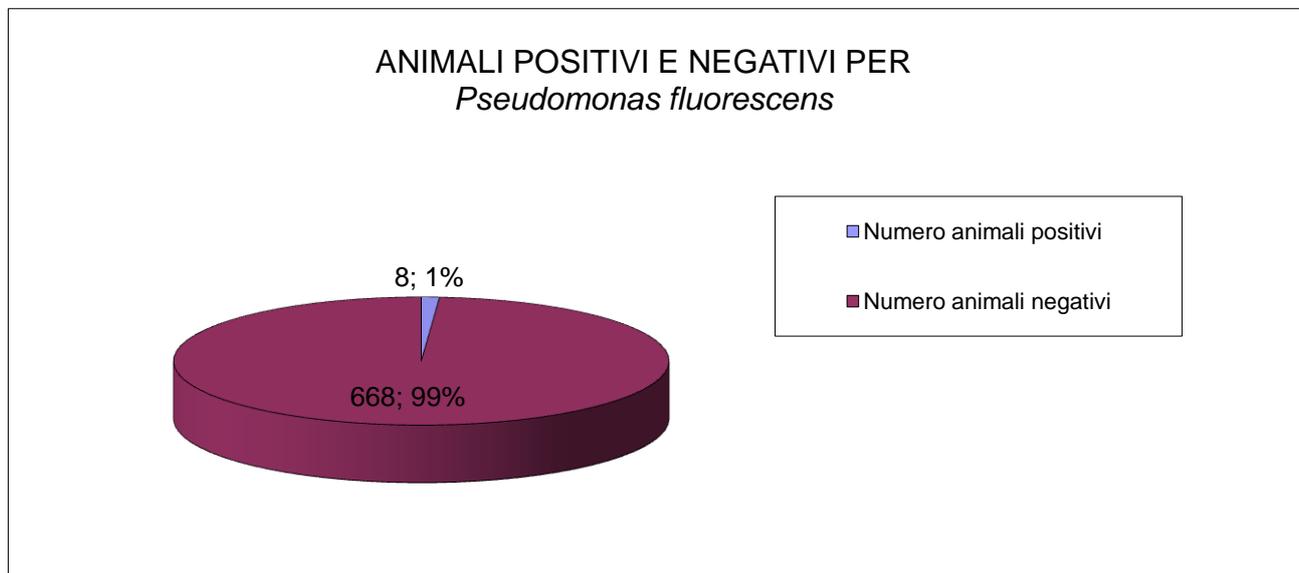


Grafico n°13

| NUMERO TOTALE DEGLI ANIMALI POSITIVI PER <i>Pseudomonas fluorescens</i> SUDDIVISI PER CATEGORIA | |
|--|----------|
| vacche positive da macello | 7 |
| vitelloni positivi da macello | 1 |

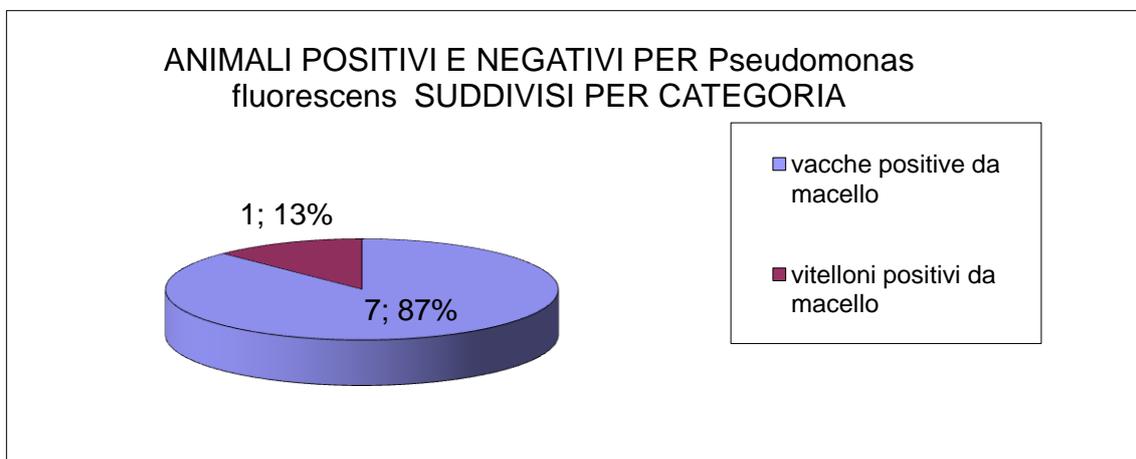


Grafico n°14

| CONFRONTO TRA ANIMALI POSITIVI PER <i>Pseudomonas fluorescens</i> E ANIMALI NEGATIVI | |
|---|------------|
| vacche positive | 7 |
| vitelloni positivi | 1 |
| animali negativi | 688 |

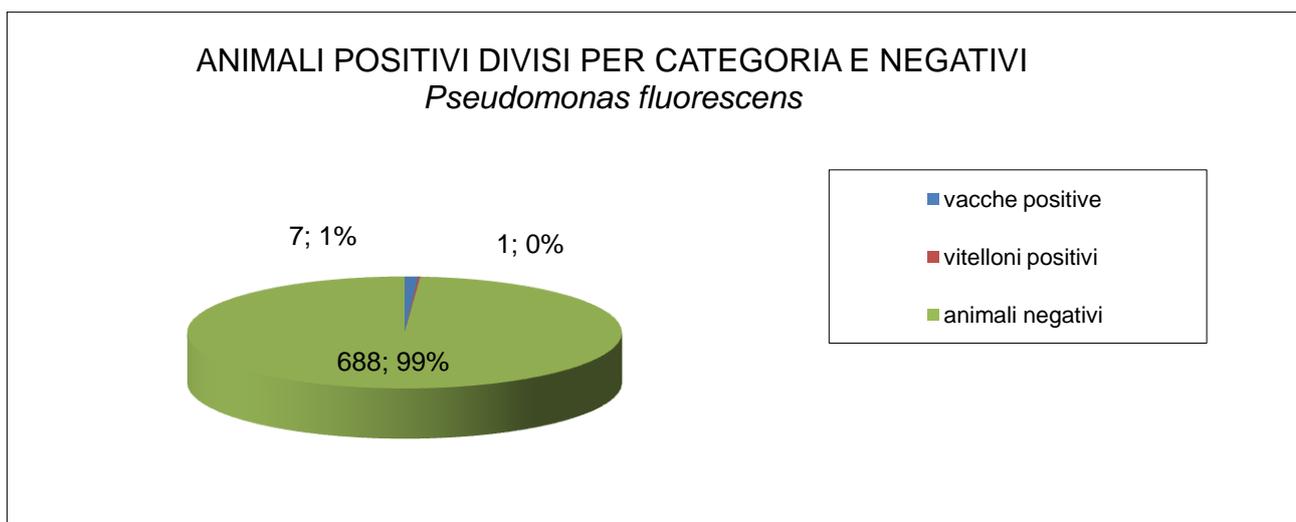


Grafico n°15

| NUMERO TOTALE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
|--|------------|
| Numero animali positivi | 5 |
| Numero animali negativi | 671 |

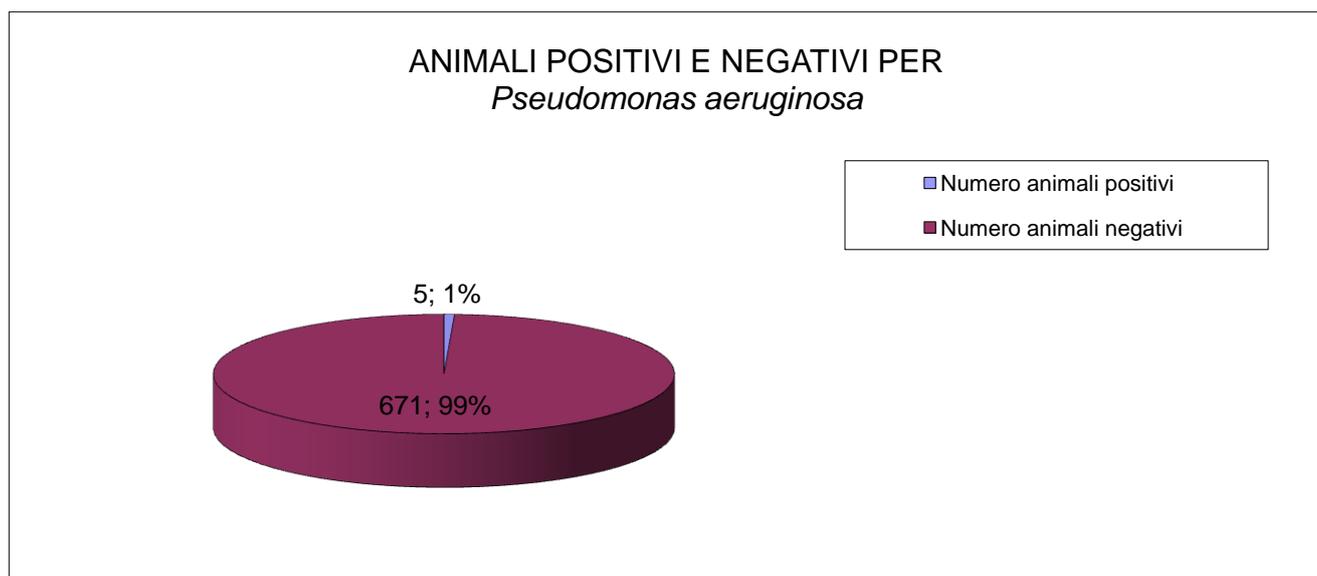


Grafico n°16

| NUMERO TOTALE DEGLI ANIMALI POSITIVI PER <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DIVISI PER CATEGORIA | |
|---|---|
| vacche da macello | 4 |
| vacche da allevamento | 1 |

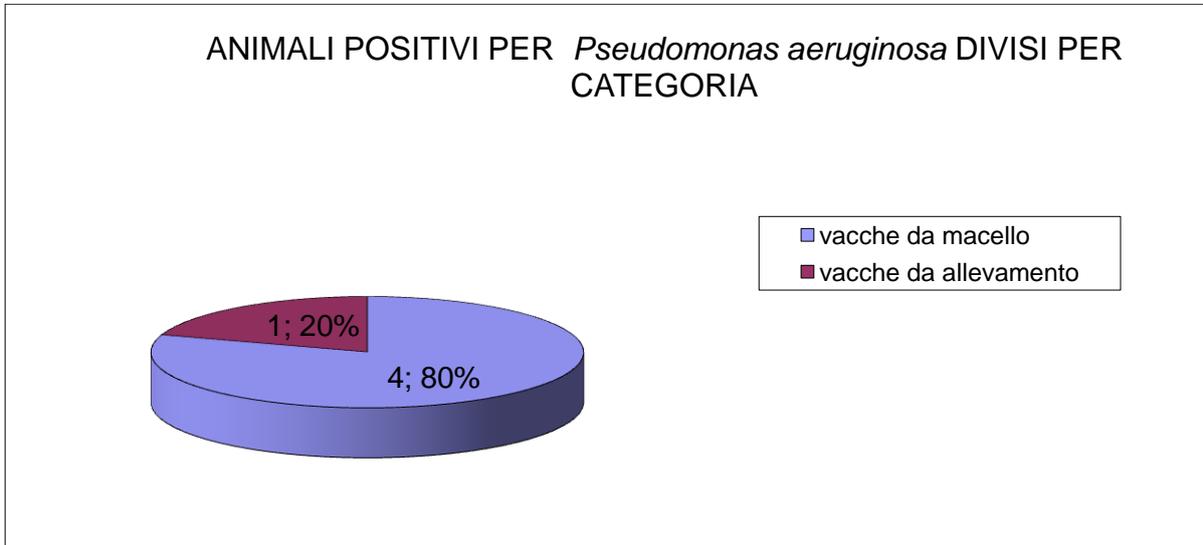


Grafico n°17

| CONFRONTO TRA ANIMALI POSITIVI PER <i>Pseudomonas aeruginosa</i> E ANIMALI NEGATIVI | |
|---|-----|
| vacche da macello positive | 4 |
| vacche di allevamento positive | 1 |
| vacche negative | 671 |

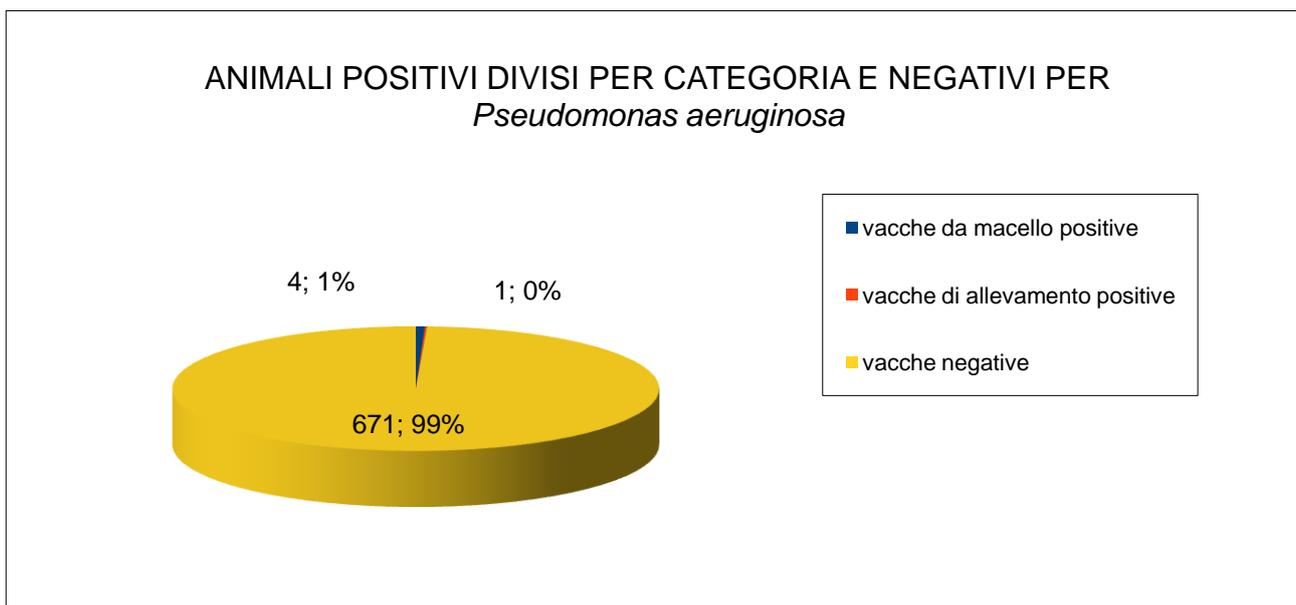


Grafico n°18

| NUMERO TOTALE <i>Pseudomonas putida</i> | |
|--|------------|
| Numero animali positivi | 5 |
| Numero animali negativi | 671 |

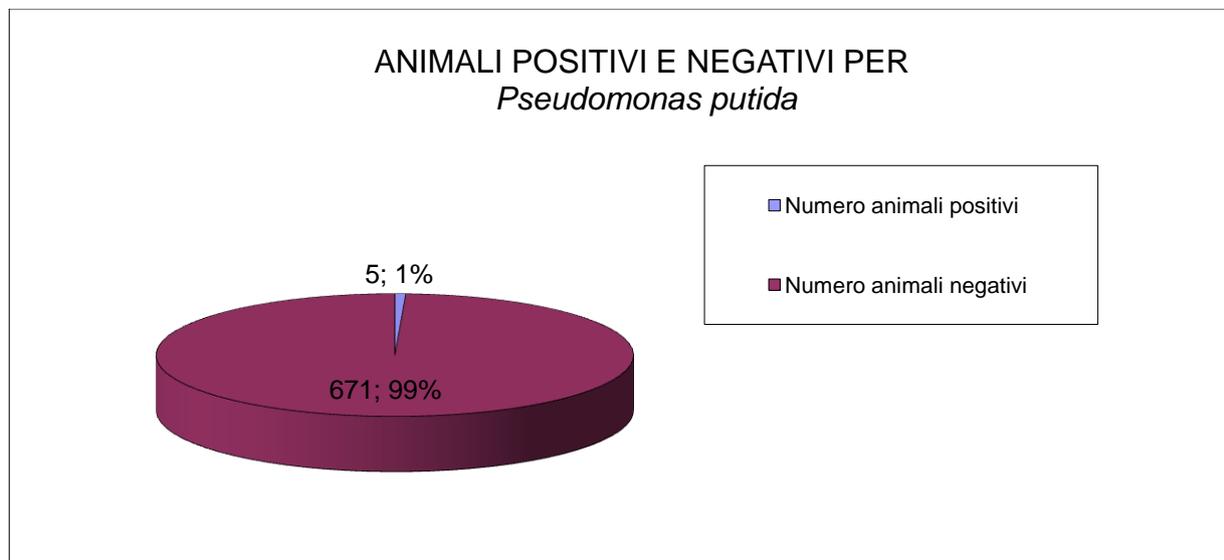


Grafico n°19

| NUMERO TOTALE DEGLI ANIMALI POSITIVI PER <i>Pseudomonas putida</i> DIVISI PER PROVENIENZA | |
|---|---|
| Vacche provenienti dal macello 1 | 2 |
| Vacche provenienti dal macello 2 | 2 |
| Vacche provenienti dagli allevamenti | 1 |

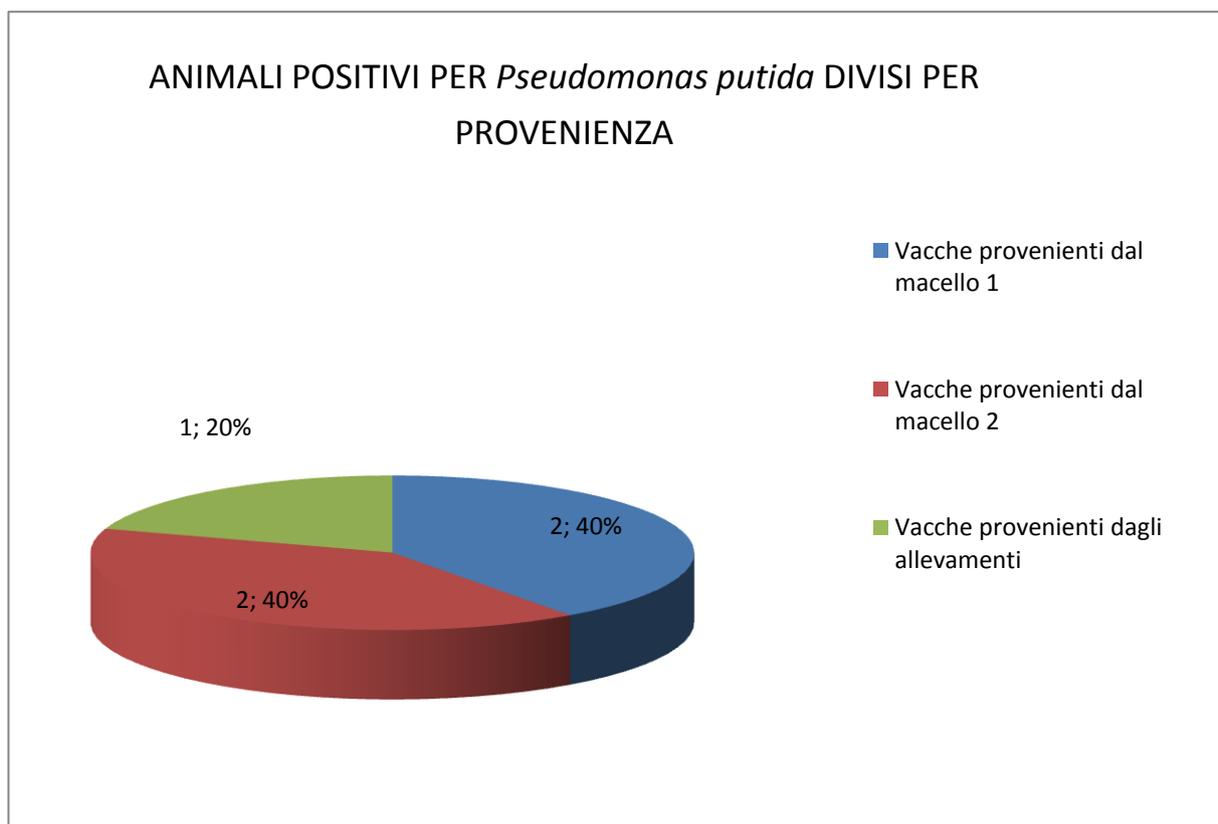


Grafico n°20

| CONFRONTO TRA ANIMALI POSITIVI PER <i>Pseudomonas putida</i> E ANIMALI NEGATIVI | |
|---|-----|
| Vacche provenienti dal macello 1 | 2 |
| Vacche provenienti dal macello 2 | 2 |
| Vacche provenienti dagli allevamenti | 1 |
| Vacche negative | 671 |

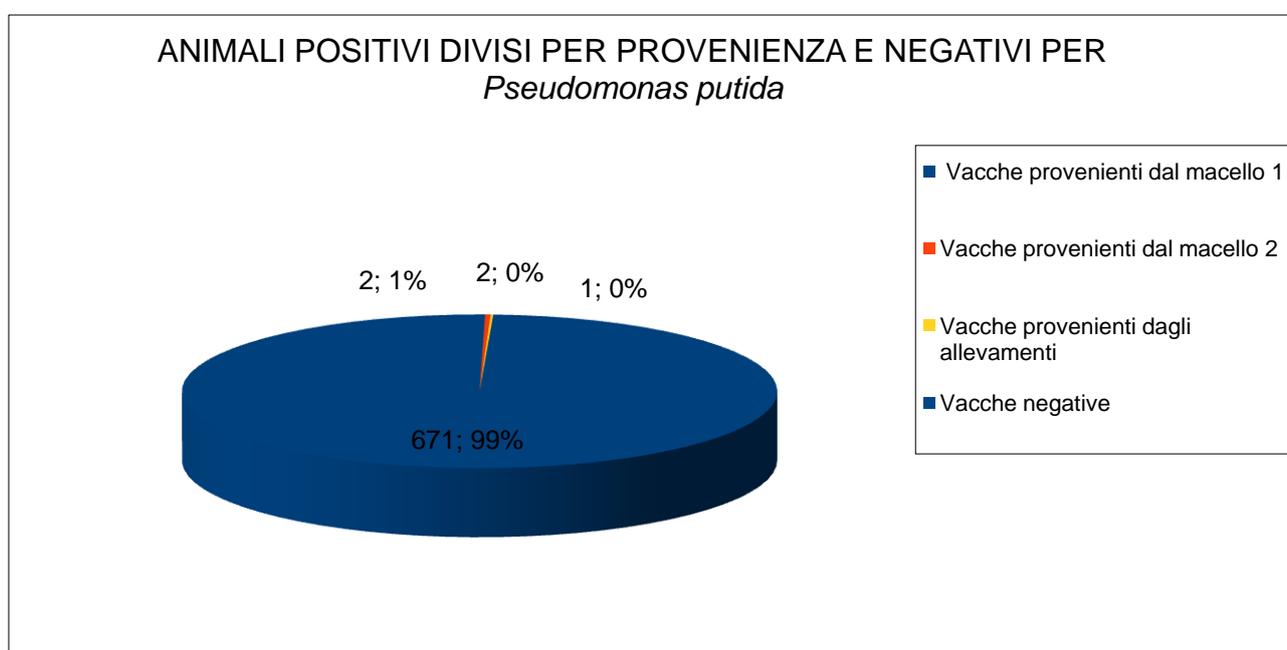


Grafico n°21

| NUMERO TOTALE <i>Pseudomonas mendocina</i> | |
|--|-----|
| Numero tot. Animali positivi | 2 |
| Numero tot. Animali negativi | 674 |

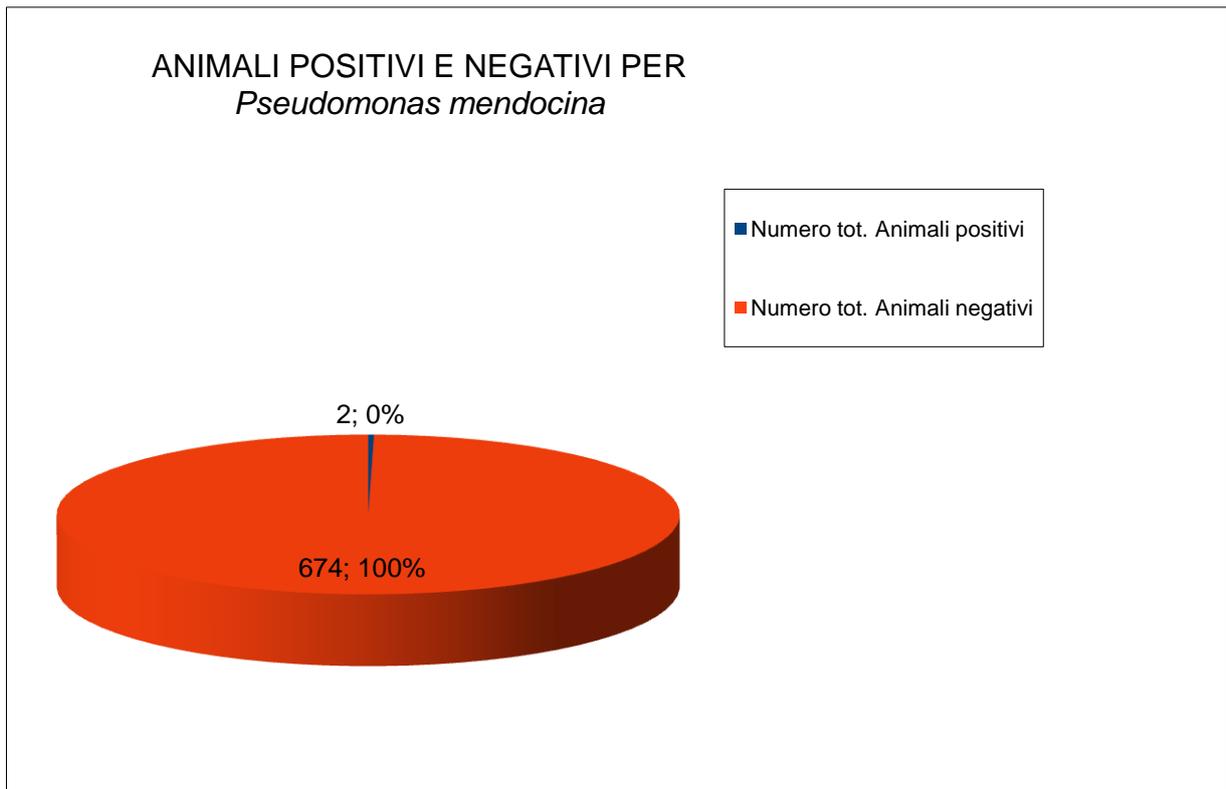


Grafico n°22

| NUMERO TOTALE DEGLI ANIMALI POSITIVI PER <i>Pseudomonas mendocina</i> DIVISI PER PROVENIENZA | |
|--|---|
| Vacche provenienti dal macello 1 | 1 |
| Vacche provenienti dal macello 2 | 1 |

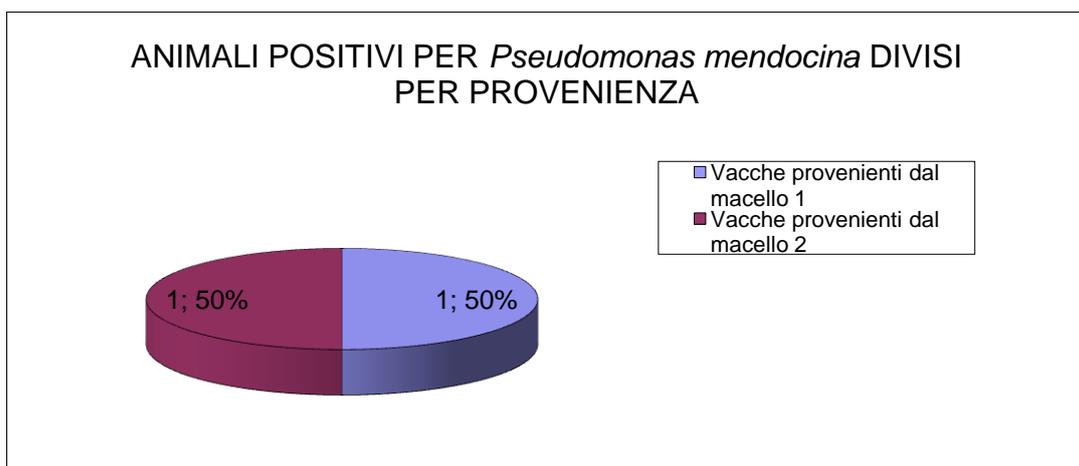


Grafico n°23

| CONFRONTO TRA ANIMALI POSITIVI PER <i>Pseudomonas mendocina</i> E ANIMALI NEGATIVI | |
|--|-----|
| Vacche positive provenienti dal macello 1 | 1 |
| vacche provenienti dal macello 2 | 1 |
| vacche negative | 674 |

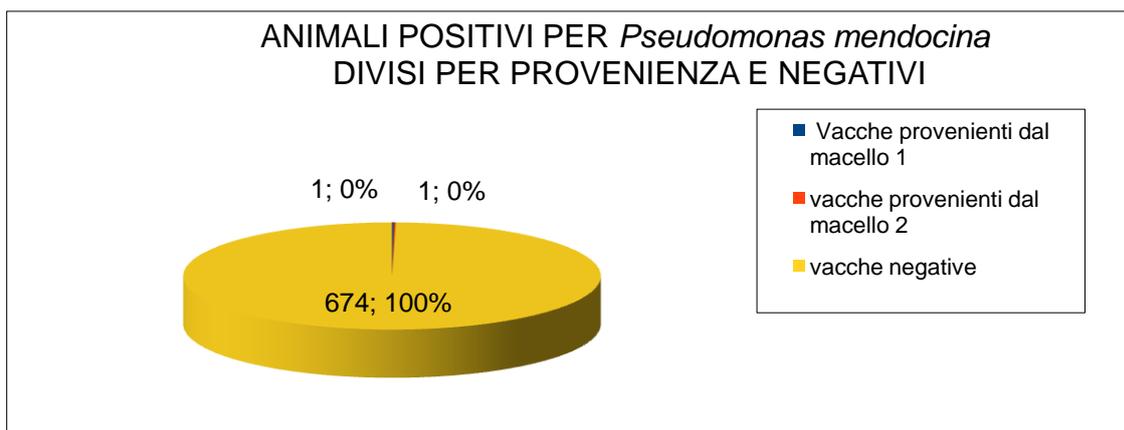


Grafico n°24

| NUMERO TOTALE <i>Burkholderia cepacia</i> | |
|---|-----|
| Numero animali positivi | 5 |
| Numero animali negativi | 671 |

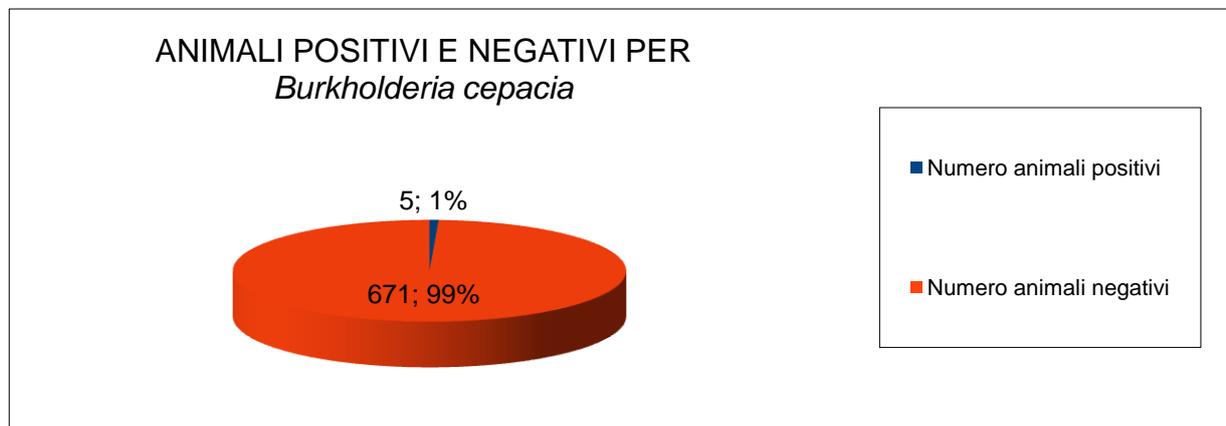


Grafico n°25

| NUMERO TOTALE animali positivi per <i>Burkholderia cepacia</i> | |
|--|---|
| Vacche provenienti dal macello 1 | 4 |
| Vacche provenienti da allevamento | 1 |

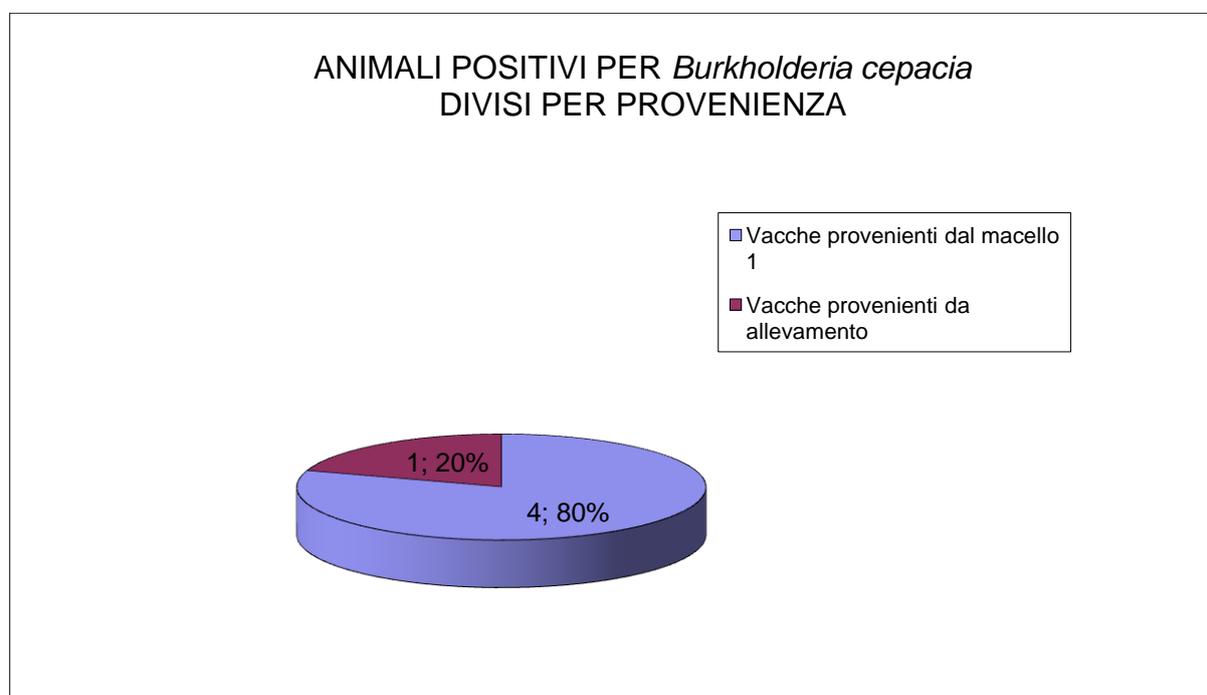


Grafico n°26

| CONFRONTO TRA ANIMALI POSITIVI PER <i>Burkholderia cepacia</i> E ANIMALI NEGATIVI | |
|--|------------|
| Vacche provenienti dal macello 1 | 4 |
| Vacche provenienti da allevamento | 1 |
| vacche negative | 623 |

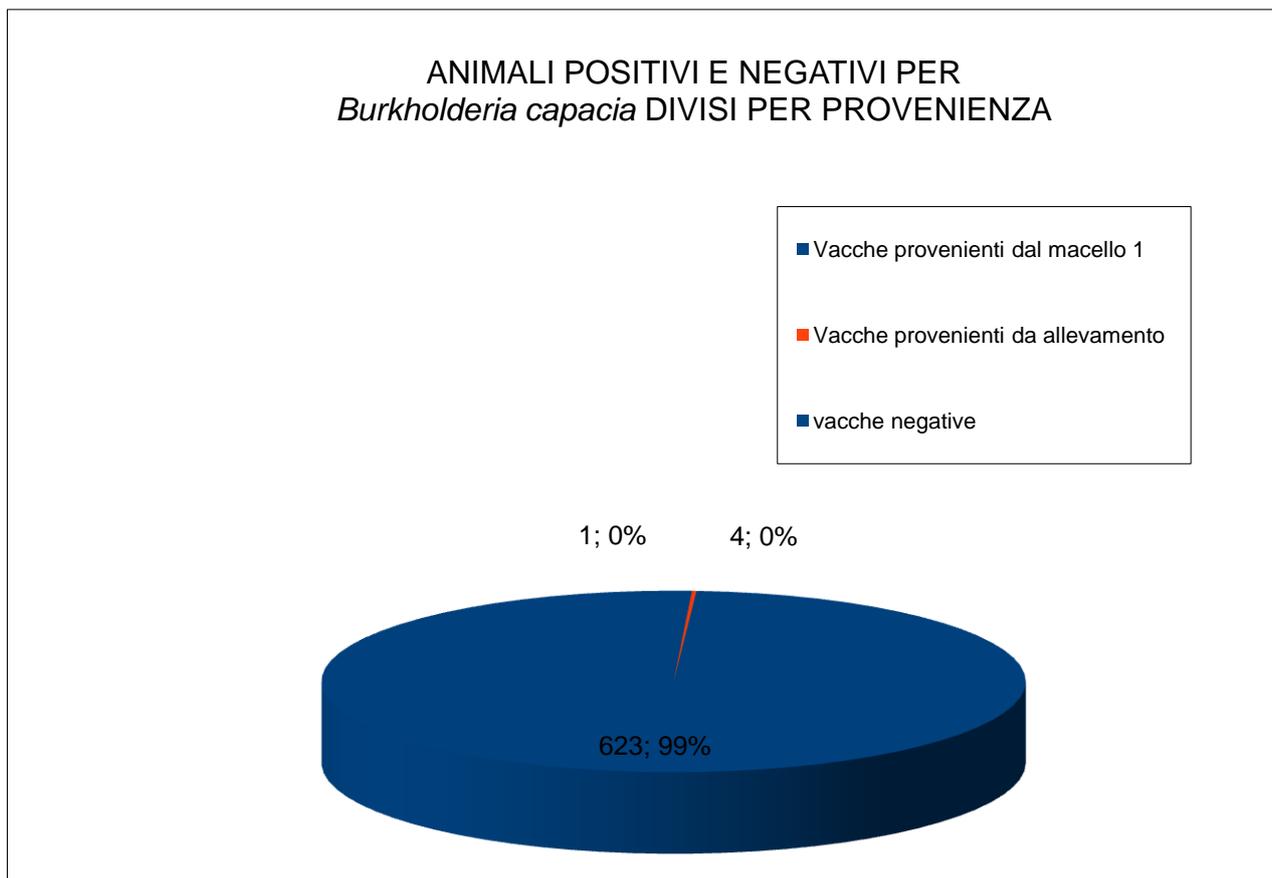


Grafico n°27

| | |
|---|-----------|
| NUMERO TOTALE ANIMALI POSITIVI PER <i>Pseudomonas</i> fluorescenti (macelli e allevamenti) | 25 |
| vacche del macello 1 positive per <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 7 |
| vitelloni positivi per <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 1 |
| vacche del macello 1 positive per <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 4 |
| vacche degli allevamenti positive per <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 |
| vacche del macello 1 positive per <i>Pseudomonas putida</i> | 2 |
| vacche del macello 2 positive per <i>Pseudomonas putida</i> | 2 |
| vacche degli allevamenti positive per <i>Pseudomonas putida</i> | 1 |
| vacche del macello 1 positive per <i>Pseudomonas mendocina</i> | 1 |
| vacche del macello 2 positive per <i>Pseudomonas mendocina</i> | 1 |
| vacche del macello 1 positive per <i>Burkholderia cepacia</i> | 4 |
| vacche degli allevamenti positive per <i>Burkholderia cepacia</i> | 1 |

ANIMALI POSITIVI DIVISI PER CATEGORIA PER PSEUDOMONAS FLUORESCENTI

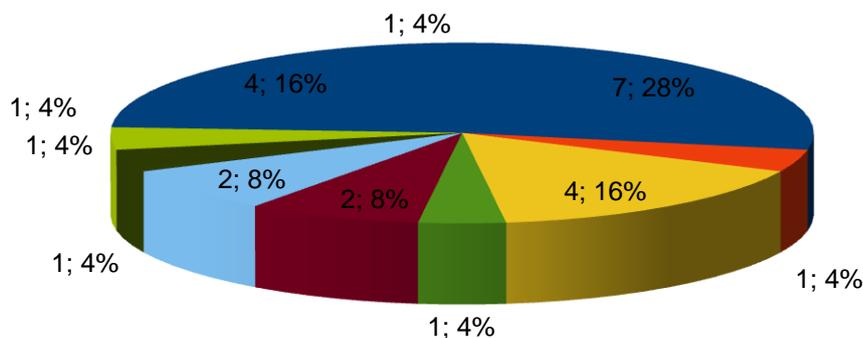
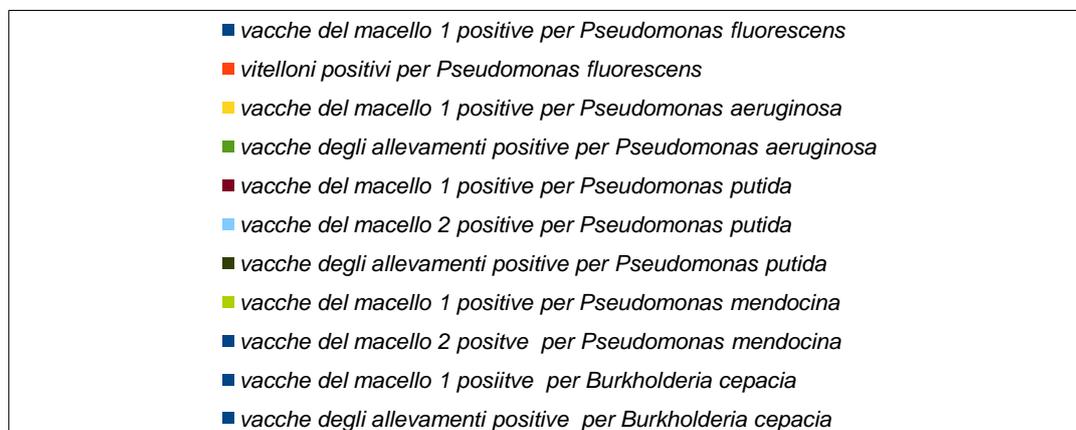


Grafico n°28

4. CONCLUSIONI

Con questa ricerca sono stati analizzati campioni di contenuto intestinale prelevati da 628 vacche, 42 vitelloni e 6 vitelli per un totale complessivo di 676 animali testati con il fine ultimo di ricercare *Pseudomonas spp.* e *Pseudomonas fluorescens*. Per quanto riguarda le *Pseudomonas spp.*, la sua presenza è stata rilevata in 656 animali, quindi questa ricerca dimostra che questo genere è largamente presente nel contenuto intestinale dei bovini.

Aeromonas spp. invece, era isolabile solo in 388 animali, che corrispondono al 57,40 %, anch'essi suddivisi in categorie di animali (330 vacche dai macelli, e soltanto 15 vacche dagli allevamenti).

Con questa tesi, oltre a dimostrare che quasi tutti gli animali testati risultano positivi per *Pseudomonas spp.*, si dimostra inoltre che solo la metà di essi sono risultati positivi per *Aeromonas spp.* In quest'ultimo caso il risultato sorprendente è la notevole differenza di positività tra vacche macellate nel Padovano (330 positive) e le vacche allevate nel Mantovano (15 positive). Tale differenza si può ipotizzare che sia dovuta per la tipologia dei prodotti agricoli utilizzati dagli allevatori del Padovano e del Mantovano, come ad esempio il fieno polifita, l'erba medica, il mais, la soia, ecc. , e l'ambiente in cui vengono coltivati. Sicuramente questi parametri vanno ad influenzare la tipologia microbica dell'intestino

L'unico studio che prende in considerazione *Pseudomonas spp.* nel contenuto intestinale dei bovini è stato condotto da Maki *et al* , nel Wyoming negli USA del 1956, confermando la presenza di questi batteri nel contenuto ileale con un animale positivo su un totale di 14 bovini testati. Mentre sempre nello stesso studio, le *Aeromonas spp.* non sono state isolate.

Dalle analisi eseguite, per quanto riguarda le *Pseudomonas* fluorescenti, ossia quelle che hanno dato fluorescenza con la lampada di Wood sono state identificate le seguenti specie:

- 8 ceppi di *Pseudomonas fluorescens*,
- 5 ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*,
- 5 ceppi di *Pseudomonas putida*,
- 5 ceppi di *Burkholderia cepacia*

Sono state isolate anche 2 ceppi di *Pseudomonas mendocina* che non emettono fluorescenza.

La positività di animali portatori asintomatici di *Pseudomonas fluorescens* riscontrata è pari a 1,04 % che è molto bassa.

Pseudomonas aeruginosa e *Pseudomonas putida* e *Burkholderia cepacia* presentano una positività pari allo 0,74 %; mentre *Pseudomonas mendocina* è ancora più rara, infatti presenta una positività ancora più bassa, pari allo 0,29%.

I dati ottenuti con questa tesi sono i primi in Italia disponibili sulla prevalenza di *Pseudomonas fluorescens* nei bovini regolarmente macellati e confermano che questi animali non sono frequenti portatori asintomatici di questo batterio.

Le *Pseudomonas* fluorescenti sono batteri aerobi, per cui la loro sopravvivenza è strettamente dipendente dall'ossigeno, infatti questo spiega la loro larga diffusione nei terreni agricoli, nelle acque di scorrimento superficiali, nel pulviscolo atmosferico, sulla superficie dei vegetali e degli animali, luoghi dove l'ossigeno è normalmente presente.

Questa caratteristica metabolica teoricamente, dovrebbe far pensare che nel lume intestinale (e quindi nelle feci dei bovini) non dovrebbero esserci *Pseudomonas* fluorescenti, perché nell'intestino teoricamente non si dovrebbe riscontrare ossigeno, o comunque se ce n'è, è presente in una quantità veramente esigua.

Le *Pseudomonas fluorescenti* e le *Burkholderia cepacia* che sono state isolate in questo lavoro, stanno ad indicare che nel contenuto intestinale dei bovini, e quindi anche negli altri animali a sangue caldo, compreso l'uomo è presente dell'ossigeno, molto probabilmente sviluppato dalle fermentazioni o dalle reazioni chimiche che si sviluppano in esso, e questo ne permette la vita a questi batteri.

I bovini rappresentano un modesto *reservoir* di *Pseudomonas fluorescens*, delle altre *Pseudomonas* fluorescenti, e di *Burkholderia cepacia*.

Si potrebbe dire che dalle conoscenze scientifiche che abbiamo in merito a questi microorganismi e alla loro presenza nel contenuto intestinale, i dati che sono stati ottenuti da questo studio sono sovrapponibili.

Come si può ben capire, il rischio che *Pseudomonas fluorescens* proveniente dalle vacche lattifere possa arrivare a inquinare il latte crudo, e da lì discendere poi, fino alla filiera produttiva dei formaggi è decisamente basso, per cui la contaminazione dei prodotti lattiero-caseari da parte di *Pseudomonas fluorescens* deriva da una contaminazione ambientale davvero, più che da una contaminazione fecale delle vacche lattifere.

Sono le acque potabili “di lavoro” utilizzate nelle industrie alimentari, nei caseifici, usate per lavare le superfici di lavoro dove vengono lavorati i formaggi a pasta filata come le mozzarelle, i formaggi freschi come lo stracchino, le principali vie di trasmissione di questo batterio.

La mia ricerca ha, però, evidenziato che *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*, che rappresentano due batteri patogeni, sono presenti nel contenuto intestinale dei bovini anche se la prevalenza è piuttosto bassa.

La tesi in questione dimostra però che esistono seppur in prevalenza bassa due batteri patogeni sopracitati sopra , *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*, soprattutto nelle persone immunodeficienti come bambini e anziani oltre a soggetti con gravi malattie a cui possono aumentare la loro mortalità.

5. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

5.1 BIBLIOGRAFIA

- 1) Crowley K.M., Prendergast D. M., Sheridan J.J., McDowell D.A. (2010). “Survival of *Pseudomonas fluorescens* on beef carcass surfaces in a commercial abattoir”. *Meat Science*, 85, 550-554.
- 2) Craven H.M. , Swiergon P., Ng S., Midegely J., Versteeg C., Coventry M.J., Wan J.(2008). “Evaluation of pulsed electric field and minimal heat treatments for inactivation of *Pseudomonas* and enhancement of milk shelf-life”. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 211-216.
- 3) Masson Y., Ainsworth P., Fuller D., Bozkurt H., İbanoğlu Ş. (2002). “Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in homogenized mushrooms under modified atmosphere”. *Journal of Food Engineering*, 54, 125-131.
- 4) Villamiel M., de Jong P. (2000). “Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Trypticase Soy Broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating”. *Journal of Food Engineering*, 45, 171-179.
- 5) Gervilla R., Felipe X., Ferragut V., and Guamis B. (1997). “Effect of Hydrostatic Pressure on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* Strains in Ovine Milk”. *Journal of Dairy Science*, 80, 2297-2303.
- 6) Leriche F., Bordessoules A. , Fayolle K. , Karoui R., Laval K. , Leblanc L. , Dufour E. (2004). “Alteration of raw-milk cheese by *Pseudomonas spp.*: monitoring the sources of contamination using fluorescence spectroscopy and metabolic profiling”. *Journal of Microbiological Methods*, 59, 33-41.
- 7) Sillankorva S., Oliveira R. , João V. M., Sutherland I., Azeredo J. (2004). “*Pseudomonas fluorescens* infection by bacteriophage Φ S1: the influence of temperature, host growth phase and media”. *FEMS Microbiology Letters*, 241, 13-20.
- 8) Wang L. and Jayarao B.M. (2001). “Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Bulk Tank Milk”. *Journal of Dairy Science*, 84, 1421-1429.
- 9) Van Tassell J.A., Martin N. H., Murphy S.C., Wiedmann M., Boor K. J. and Ivy R.A.(2012). “Evaluation of various selective media for the detection of *Pseudomonas species* in pasteurized milk”. *Journal of Dairy Science*, 95, 1568-1574.
- 10) Kives J., Guadarrama D., Orgaz B., Rivera-Sen A., Vazquez J., and Sanjose C. (2005). “Interaction in Biofilms of *Lactococcus lactis spp. cremoris* and *Pseudomonas fluorescens* Cultured in Cold UHT Milk”. *Journal of Dairy Science*, 88, 4165-4171.

- 11) Lebert I., Begot C., Lebert A. (1998).
“Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5,8-7,0), water activity (0.97-1.00) and temperature (7-25°C)”. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 53-60.
- 12) Jayarao B. M., and Wang L. (1999).
“A Study on the Prevalence of Gram-Negative Bacteria in Bulk Tank Milk”. *Journal of Dairy Science*, 82, 2620-2624.
- 13) Tyrer H., Ainsworth P., İbanoğlu Ş., Bozkurt H. (2004). “Modelling the growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in ready-to-eat meals”.
Journal of Food Engineering, 65, 137-143.
- 14) Munsch-Alatossava P., Gursoy O., Alatossava T.(2010). “Potential of nitrogen gas (N₂) to control psychotrophs and mesophiles in raw milk”. *Microbiological Research*, 165, 122-132.
- 15) Chen J., Su Z., Liu Y., Liu S., Wang S., Dai X., Li Y., Peng S., Shao Q., Zhang H., Wen P., Yu J., Huang X., Xu H. (2009). “Identification and characterization of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Zhenjiang, China”.
International Journal of Infectious Disease, 13, 717-721.
- 16) Tielen P., Strathmann M., Jaeger K-E. , Flemming H.-C. , Wingender J. (2005). “Alginate acetylation influences initial surface colonization by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*”.
Microbiological Research, 160, 165-176.
- 17) Yamaguchi N. , Kitaguchi A. and Nasu M. (2012). “Selective enumeration of viable *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.* In milk within 7 h by multicolor fluorescence in situ hybridization following microcolony formation”. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, xx, xx, xxx-xxx.
- 18) Matselis E. and Roussis I.G. (1998).
“Proteinase and lipase production by *Pseudomonas fluorescens*. Proteolysis and lipolysis in thermized ewe's milk”. *Food Control*, 9, 5, 251-259.
- 19) Martin N.H., Murphy S.C., Ralyea R.D., Wiedmann M. and Boor K. J. “When cheese gets the blues: *Pseudomonas fluorescens* as the causative agent of cheese spoilage”.
Journal of Dairy Science, 94, 3176-3183.
- 20) Page D. R., Meyer S., Garry F. and Hirst H. (2000). “Sources of *Pseudomonas spp.* In Bulk Tank Milk on Colorado Dairy Farms”. Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA.
- 21) Rainey P. B. (1999). “Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere”.
Environmental Microbiology 1, 3, 243-257.
- 23) Meyer J.M. and Abdallah M.A.(1978). “The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties”.

- 24) Robleto E. A., López-Hernández I., SilbyMark W. and Levy S.B. (2003). "Genetic Analysis of the AdnA Regulon in *Pseudomonas fluorescens*: Nonessential Role of Flagella in Adhesion to Sand and Biofilm Formation". *Journal of bacteriology*, 453-460.
- 25) Marro S., Griglio B., Testa A., Piovesan F., Civera T. (2011). "Alterazioni organolettiche negli alimenti causate da Pseudomonadaceae e possibili ricadute per la sanità pubblica". Ce.I.R.S.A Centro Interdipartimentale di Ricerca e Documentazione per la Sicurezza Alimentare, 1, 1-10.
- 26) Sechi P., Vizzani A., Scuota S., Zicavo A., Parmegiani S., Cenci Goga. B. (2010). "Riproduzione sperimentale della colorazione blu da *Pseudomonas fluorescens* biovar IV in un formaggio a pasta filata". *Italian Journal of Food Safety*, 1, 1, 81-84.
- 27) Casaz P., Happel A., Keithan J., Read D. L., Strain S. R. and Levy S. B. (2001). "The *Pseudomonas fluorescens* transcription activator AdnA is required for adhesion and motility". *Microbiology*, 147, 355-361.
- 28) Song B., Leff L. G. (2006). "Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*". *Microbiological Research*, 161, 355-361.
- 29) Rhodes M. E.(1959). "The Characterization of *Pseudomonas fluorescens*". *Journal of general Microbiology* ,21, 221-263.
- 30) Thomas L.V., Wimpenny J.W.T. (1996). "Competition between *Salmonella* and *Pseudomonas species* growing in and on agar, as affected by pH, sodium chloride concentration and temperature". *International Journal of Food Microbiology*, 29, 361-370.
- 31) Geysen S., Escalona V.H., Verlinden B.E., Aertsen A., Geeraerd A.H, Michiels C.W., Van Impe J.F., Nicolaï B.M. (2006). "Validation of predictive growth models describing superatmospheric oxygen effects on *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* on fresh-cut lettuce". *International Journal of Food Microbiology*, 111, 48-58.
- 32) Picot L., AbdelmoulaSana M., Merieau A., Leroux P., Cazin L., Orange N., Feuilloley M.G.J. (2001). "*Pseudomonas fluorescens* as a potential pathogen: adherence to nerve cells". *Microbes and Infection*, 3, 985-995.
- 33) Mezghani-Abdelmoula S., Khémiri A., Lesouhaitier O., Chevalier S., Orange N., Cazin L., Feuilloley M.G.J. (2004). "Sequential activation of constitutive and inducible nitric oxide synthase (NOS) in rat cerebellar granule neurons by *Pseudomonas fluorescens* and invasive behaviour of the bacteria". *Microbiological Research*, 159, 355-363.
- 34) Zavanella M., D'Incau M. (2004). "Osservazioni su un patogeno sempre più temibile: *Pseudomonas aeruginosa*". *Bollettino di Microbiologia e Indagini di Laboratorio*, 10, 2.
- 35) "Trattato di Malattie infettive degli animali" di Farina R., Scatozza F. (1998). XXIV-944, , 2 ed., 135-142.
- 36) Maki L.R. and Picard K. (1965).

- “Normal Intestinal Flora of Cattle Fed High-Roughage Rations”. *Journal of bacteriology*, 89, 5; 1244 – 1249.
- 37) Mushin R., Ziv G. (1972). “An epidemiological study of *Pseudomonas aeruginosa* in cattle and other animals by pyocine typing”. *J. Hyg., Camb.* (1973), 71,113.
- 38) “Microbiologia degli alimenti di origine animale” di Tiecco G. (2000) XII-640, 6 ed., 33-38; 92-98; 170-176, 719-720.
- 39) “Biochimica e biotecnologia del ruminante” di Mariani A.P. , Podestà A. (1996) VIII-128, 7-24.
- 40) “La Settimana Veterinaria” – N° 555 – 14 marzo 2007
- 41) Giaccone V. (2010). “*Pseudomonas* e prodotti lattiero-caseari”. *Medicina Veterinaria Preventiva-supplemento al n.32*
- 42) Tayeb A. L., Ageron E., Grimont F., Grimont P.A.D (2005). “Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates”. *Research in Microbiology*, 156, 763-773.
- 43) Bacci C., Paris A., Brindani F., 2002.
“Ruolo di *Clostridium* spp. in alterazioni del Parmigiano Reggiano riconducibili a gonfiore tardivo”. *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma*, XXII, 221 -231.

5.2 WEBGRAFIA.

- 1) www.msd-italia.it/altre/manuale/sez13/1571264.html
ultima consultazione //26/05/12
- 2) www.scattidigusto.it agg. // 27/08/10
ultima consultazione //26/05/12
- 3) www.2.vet.unibo.it agg. //20/05/09
ultima consultazione //25/05/12
- 4) www.internationalpbi.it/docs/PBI/seminari/relazioni/batteri-alteranti.pdf agg. // 30/03/11
ultima consultazione 25/05/12
- 5) www.scienceclarified.com agg. // 19/03/11
ultima consultazione 25/05/12
- 6) www.microblog.me.uk agg. 09/03/10
ultima consultazione 25/05/12
- 7) www.dermatlas.med.jhmi.edu agg. 29/04/12
ultima consultazione 25/05/12
- 8) www.optometry.it agg. 07/02/12
ultima consultazione 25/05/12
- 9) www.otologiabologna.it agg. // 09/01/07
ultima consultazione 25/05/12
- 10) www.utp-pd.it agg. // 06/02/12
ultima consultazione 26/05/12
- 11) www.minermais.com.br agg. // 21/05/12
ultima consultazione 26/05/12
- 12) www.dirittodicritica.com agg. // 14/02/12
ultima consultazione 26/05/12
- 13) www.adnkronos.com agg. // 26/06/10
ultima consultazione 25/05/12
- 14) www.saporiericette.blogosfere.it agg. // 06/08/12
ultima consultazione 26/05/12
- 15) www.cucina.ilbloggatore.itagg. // 19/05/12
ultima consultazione 26/05/12
- 16) www.spesacritica.com agg. // 14/12/10

ultima consultazione 26/05/12

17) www.dissapore.com agg. // 06/08/10
ultima consultazione 26/05/12

18) www.it.123ref.com agg. // 23/09/11
ultima consultazione 25/05/12

19) www.bressanini-lescienze.blogautore.espresso.repubblica.it agg. // 18/07/11
ultima consultazione 25/05/12

20) www.tgw1916.net agg. // 22/07/11
ultima consultazione 25/05/12

21) www.microbe-edu.it agg. // 19/05/12
ultima consultazione 25/05/12

22) www.imbalstock.it agg. // 22/07/11
ultima consultazione 26/05/12

23) www.biosigma.it agg. // 31/01/12
ultima consultazione 25/05/12

24) www.fibrosicisticaricerca.it/Fibrosi-Cistica/Domande-piu-frequenti/Burkholderia-cepacia-lessenziale-da-conoscere agg. // 17/07/07
ultima consultazione 26/05/12

25) http://www.linkontro.info/index.php?option=com_content&view=article&id=4882:le-mozzarelle-blu-e-il-declino-dellagricoltura-nostrana&catid=42:effetto-terra&Itemid=77
agg. // 04/01/12
ultima consultazione 26/05/12

RINGRAZIAMENTI

Rivolgo un grande ringraziamento, al Chiarissimo Professore Valerio Giaccone per avermi accompagnato in questo percorso con la Sua speciale competenza professionale, i Suoi preziosi insegnamenti e per avermi fatto accrescere amore ed interesse per le materie da Lui insegnate.

Un grazie particolare alla Dott.ssa Ioanna-Lucia Radu e al Dott. Riccardo Miotti Scapin per la loro disponibilità, i loro insegnamenti e per avermi reso speciale con la loro amicizia questo periodo della mia vita.

Al Professore Leonardo Alberghini per i validi consigli.

Al Dott. Roberto Pisani per la Sua disponibilità.

Ai miei amici.

Dedico questa tesi alla mia famiglia che con tanto amore mi ha accompagnato e sostenuto fino al traguardo.

A mio nonno che per primo ha capito la mia grande passione per gli animali.