

ISSN – 0391 – 1675
ISTISAN 84/5

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

Corso teorico pratico:
Aspetti igienici della produzione degli alimenti

Roma, Istituto Superiore di Sanità
30 novembre - 1 dicembre 1983

Roma, marzo 1984

INDICE DELLE RELAZIONI

- ✓ R. MONACELLI - Introduzione al Corso iii
- ✓ G. DE FELIP - Problemi emergenti nella igiene della produzione degli alimenti. p 1-7
- ✓ F. K. KÄFERSTEIN - WHO Safety Programme p 9-15
- ✓ D. GRECO - Aspetti epidemiologici del ruolo degli alimenti nella trasmissione di malattie batteriche. p 17-32
- ✓ C. CANTONI, S. D'AUBERT, C. BERSANI - Focolai di inquinamento microbico nella produzione e distribuzione degli alimenti carnei e della pesca. p 35-121
- ✓ L. VOLTERRA - Tossinfezioni alimentari da biotossine marine. p 123
- ✓ L. OREFICE - Monitoraggio microbiologico a livello di locali, attrezzature e personale nella industria alimentare. p 135

INTRODUZIONE AL CORSO

Prof. Riccardo MONACELLI

Direttore Laboratorio Alimenti - I.S.S.

Le caratteristiche finali di un prodotto alimentare sono strettamente correlate ad una serie di norme igieniche da adottare a livello di produzione e distribuzione; la loro inosservanza, come è noto, può compromettere la validità anche di materie prime ineccepibili.

Tali norme, peraltro, non sempre sono agevolmente codificabili in schemi rigidi ed immutabili, sia per la necessaria elasticità operativa derivante da situazioni produttive diverse, sia per la molteplicità dei problemi sanitari e tecnici che esse coinvolgono.

In questi nostri incontri verranno focalizzati alcuni aspetti dell'ampia tematica, scelti tra quelli di maggiore interesse e di più recente sviluppo.

Augurando un lavoro proficuo, desidero rivolgere un vivo ringraziamento ai partecipanti a questo Corso ed ai loro organizzatori.

PROBLEMI EMERGENTI NELL'IGIENE DELLA PRODUZIONE ALIMENTARE.

Prof. Giordano DE FELIP

Laboratorio Alimenti - I.S.S.

Con l'emanazione della legge 283 dell'ormai lontano aprile '62 è stata predisposta una serie di norme quadro nel settore degli alimenti che, nell'attuazione pratica da parte degli organi di controllo, ha talora assorbito parte preponderante delle disponibilità operative nel "monitoraggio" di prodotti finiti, pronti per il consumo.

Ciò costituisce, certamente, una fase di estrema utilità; ma la tutela igienico-sanitaria verrebbe vanificata se anche a livello della produzione non venisse costantemente praticata un'opera di guida, di sorveglianza, di monitoraggio.

E' evidente che una trattazione organica degli "aspetti igienici della produzione degli alimenti" richiederebbe molto più del tempo a disposizione in questi nostri incontri: cercheremo, pertanto, di focalizzare insieme soltanto alcuni di essi, tra quelli di maggiore interesse ed attualità.

E' noto infatti, che una trattazione organica delle condizioni igieniche di produzione degli alimenti in genere coinvolge non solo aspetti strettamente sanitari, ma anche economico-sociali ed ecologici.

Questi ultimi, in particolare, condizionano sempre più pesantemente la nostra problematica sì da costituire, spesso, la prima causa e l'ultimo anello di una complessa serie di eventi.

A puro titolo di esempio, soffermiamoci un momento sul problema della produzione igienica dei prodotti carnei, così strettamente legato a quello della diffusione di enterobatteri patogeni.

E' difficile stabilire quanta parte del problema stesso sia legato a situazioni ambientali - allevamenti intensivi, eutrofizzazione dei corsi d'acqua, impiego di mangimi importati dall'estero, contaminazioni delle aree di allevamento - e quanta parte sia legata ad inosservanza delle norme igieniche nelle fasi di lavorazione delle carni.

Si tratta, evidentemente, di un discorso estremamente complesso che richiede la collaborazione di discipline, esperienze e livelli di responsabilità diversi: è altrettanto chiaro, comunque, così come è emerso dall'esperienza degli ultimi anni, che una sorveglianza igienica del prodotto finito, da sola, non può essere sufficiente.

Avvicinandoci maggiormente alla tematica di questi nostri incontri, vorrei ricordare che la parola "igiene" ha perso parte del suo significato di origine: ciò è legato al progresso delle tecnologie di produzione, alla loro crescente automatizzazione, allo sviluppo di procedimenti automatici di bonifica degli impianti (cleaning systems), alla utilizzazione di materiali e superfici di lavoro che consentono più razionali processi di detersione o disinfezione.

Nonostante queste premesse, tuttavia, l'esperienza dimostra che nel tessuto produttivo si possono verificare e si verificano "smagliature" che possono essere all'origine di caratteristiche finali dell'alimento non idonee

dal punto di vista igienico-microbiologico o che, peggio, possono essere causa di episodi tossinfettivi.

Quarto sopra, pertanto, comporta la necessità di procedimenti di pulizia, bonifica, disinfezione degli impianti ed attrezzature che dovrebbero essere codificati su misura, a seconda del tipo di produzione.

L'impiego dei disinfettanti dovrebbe essere "mirato" anche in base a verifiche periodiche della microflora generalmente prevalente nei circuiti di trasformazione e produzione dell'alimento con ricorso, in tempi prefissati o in relazione a segnali di pericolo, ad "antisetticogrammi" da eseguire su ceppi batterici appartenenti alla predetta flora.

Ciò permetterebbe, tra l'altro, una più razionale alternanza nell'impiego di antisettici diversi e la riduzione di forme di resistenza rilevabili anche a livello di disinfettanti.

A questo proposito è bene accennare brevemente a due aspetti, strettamente correlati, dell'impiego dei disinfettanti - o antisettici - in genere.

Il primo concerne la molteplicità dei meccanismi d'azione di questi composti, che si esplicano a livello di strutture diverse della cellula batterica.

Ad esempio i sali quaternari di ammonio, la clorexidina, la tricarbammide, il fenossietanolo modificano il potenziale elettrico della membrana batterica e ne alterano i processi di ossidoriduzione e di fosforilazione; il fenolo e la cetrimmide, invece, interferiscono prevalentemente sulla permeabilità della predetta membrana.

Gli iodati, gli ipocloriti, l'ossido di etilene, la

acqua ossigenata agiscono prevalentemente a livello di gruppi SH.

Fenolo derivati ed alcali in genere interagiscono con il ribosio cellulare e simili, mentre la formaldeide e la glutaraldeide esplicano la loro attività prevalentemente a livello di aminogruppi citoplasmatici.

Il secondo aspetto dell'impiego di antisettici in genere, è legato a molteplici meccanismi di resistenza che la cellula batterica è in grado di contrapporre a questi composti. E' noto, ad esempio, che schizomiceti specialmente Gram negativi possono utilizzare, in seguito a processi di resistenza, i composti fenolici quali fonti di carbonio; ceppi antisetticoresistenti di E.coli, Ps.aeruginosa, S.aureus possono trasformare lo ione mercurico in organoderivati volatili inattivi con meccanismi plasmidici.

Quanto sopra indicato, inoltre, andrebbe correlato ad operazioni di monitoraggio microbiologico da eseguire, secondo schemi prefissati per ciascun tipo di impianto e di produzione, a livello dei locali, delle attrezzature, delle superfici di lavoro, delle mani, addetti alla lavorazione e, infine, dell'aria dei locali ove questa viene eseguita.

Tale monitoraggio andrebbe articolato in parte secondo uno schema base fisso per taluni aspetti (ad esempio prelievi all'inizio, a metà, verso la fine dell'orario di produzione) e in parte secondo schemi variabili da studiare - specialmente per quanto concerne i punti di prelievo - a seconda del tipo e volume di produzione.

Il significato ed utilità di tali accertamenti sono noti a tutti: va segnalato però, che i dati sperimentali

e l'esame critico di questi dati si sono notevolmente arricchiti in questi ultimi anni, portando a conclusioni spesso interessanti e talora sorprendenti.

A puro titolo di esempio ricorderò che l'analisi statistica applicata alla disinfezione delle mani condotta comparativamente con sei tra i più noti e diffusi antisettici, ha dimostrato la reale efficacia, nelle normali condizioni di impiego, di soli due di essi!

Come accennato in precedenza, tuttavia, il monitoraggio, articolato fondamentalmente in sei punti, dovrebbe essere condotto in condizioni ordinarie, salvo quindi interventi di emergenza, ad intervalli ed in quantità prefissati strettamente correlati, ripeto, alla natura e modalità di produzione e all'entità della medesima.

Compito non facile: si tratta di operare in un settore ove i dati sperimentali "sul campo" e di conseguenza, quelli normativi sono certamente lacunosi. Siamo ancora lontani, infatti, da schemi o "piani di campionamento" relativi ai problemi specifici sopra indicati: essi potranno essere sviluppati su base collegiale, in seguito a indagini conoscitive ed al raffronto dei dati ottenuti in sedi e condizioni diverse.

Relativamente al contenuto microbico dell'aria in relazione alla produzione di alimenti sono state fatte recentemente molte indagini. Vorrei soltanto ricordare che il suo significato presenta due aspetti: il primo generale quale indice aspecifico indiretto di igienicità di un determinato ambiente, il secondo specifico da correlare ed interpretare in base al tipo di alimento che in quell'am-

biente viene prodotto.

Un discorso a parte merita la sorveglianza igienica dei circuiti di bonifica termica (pastorizzatori, scambiatori di calore, autoclavi) e di raffreddamento: processi di trattamento termico e di refrigerazione inadeguati occupano tuttora i primi posti tra le cause di insufficiente qualità igienica dei prodotti alimentari. Recenti statistiche del C.D.C. di Atlanta hanno confermato che le cause più frequenti di episodi tossinfettivi sono da attribuire ad inosservanze igieniche nella preparazione di alimenti a livello familiare: su 1.615 episodi verificatisi negli U.S.A. nel 1970, solo 104 (pari al 6%) erano dovuti ad alimenti preparati industrialmente.

Va tuttavia tenuto presente che un errore igienico a livello di produzione industriale può costituire un vero e proprio "centro" di diffusione di tossinfezioni di varia natura: a puro titolo di esempio si ricorda che, negli anni '70, un solo lotto di gelato contaminato procurò 14 differenti focolai tossinfettivi con 9.000 casi di salmonellosi in 4 Stati U.S.A.

Più recentemente, cioccolato al latte prodotto in Italia ed esportato in Inghilterra, ha procurato casi di salmonellosi.

In questa breve rassegna ho soltanto introdotto argomenti che, in maniera più ampia ed esauriente, verranno sviluppati dai singoli relatori.

Prima di concludere vorrei soltanto far presente che le normative in materia, pur se attuali ed aggiornate, rivestono spesso e per difficoltà obiettive un carattere in-

dicativo, non dettagliato. Ritengo che norme più mirate, con più precisi riferimenti operativi potranno essere elaborate sulla base di indagini e scambi informativi comuni ed allargati.

o o o o o o o

WHO FOOD SAFETY PROGRAMME

Dr. F.K. Käferstein

Responsible Officer, Food Safety

Activities related to food safety* have been carried out almost since the inception of the World Health Organization. The Expert Committee on Environmental Sanitation held in 1955 dealt with Food Hygiene, and the Joint FAO/WHO Food Standards Programme, a component of the present Food Safety Programme, came into being in 1963. Other milestones of WHO's contribution to food safety are the various meetings on specific food commodities such as meat (1961), milk (1969), fish and shellfish (1973), and on specific subjects such as food microbiology (1967 and 1976), food additives (yearly since 1956) and on pesticide residues (yearly since 1961). Many of these activities have been or are being held in collaboration with our sister organization, FAO.

*Food safety: All conditions and measures that are necessary, during the production, processing, storage, distribution and preparation of food, to ensure that it is safe, sound, wholesome, and fit for human consumption; also the quality of food's being safe for consumption by man.

Note: 1. The term "food safety" should not be confused with "food security", a term that is used to refer to the availability of food. 2. The term "food safety" is rather new and the terms "food hygiene", "food protection", and "food sanitation" have often been used with the same or a similar

However, when WHO began to prepare for the implementation of the Global Strategy for Health for All by the Year 2000, it was felt that these past and ongoing activities covered too narrow an aspect of food safety, and did not significantly touch upon many areas of public health concern, particularly, for example, the vital area of reducing diarrhoeal disease. It was therefore decided that the direction of the Food Safety Programme should be reoriented, and that convening an Expert Committee to deal with all aspects of food safety could help the Organization to better define its relative priorities in this field.

In planning for this Expert Committee it became obvious that much was to be gained in joining forces with FAO, which also has a long history of consumer protection through its food quality control activities.

This Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Safety which met in Geneva from 30 May to 6 June 1983 noted that for several decades national and international agencies have fought the battle to improve the health for all the peoples of the world. Although substantial progress has been made, much more needs to be done if the goal of Health for All by the Year 2000 is to be met. In particular, the impact on health of food-borne illness associated with contamination of the food supply has not been well recognized by national governments or effectively approached by international organizations. To a significant extent,

meaning, although usage varies in different regions of the world.

the ubiquitous nature of the problem has made it less visible than the more dramatic but less globally significant outbreaks of other diseases which have received greater attention and resources than food safety. Indeed, the Alma-Ata Declaration in 1978 only implicitly considers food safety as an essential component of PHC rather than addressing it explicitly as a major component contributing significantly to disease prevention and health promotion. There was in 1980 alone more than 1,000 million cases of acute diarrhoea in children under 5 in the developing world (excluding China). Of these, 5 million children died, at a rate of 10 diarrhoeal deaths every minute of every day of every year. A substantial number of these are caused by food, directly by microbiological contamination and indirectly by reducing nutritional status in marginally nourished children. When one adds to this total non-diarrhetic foodborne diseases such as botulinum, typhoid and parasitism as well as the chronic effects of chemical contaminations of foods, the number of affected people and its impact of function and wellbeing is appalling.

Equally important is the effect of such widespread acute and chronic debilitation on the economy and financial conditions of the world community. The Expert Committee noted for example, that in 1977 the total loss attributable to salmonellosis in Germany (FRG) was DM 240 million. In the US alone, over US\$ 65 million of food were rejected for entry in a one three-month period. In the developing world, with more marginal economies, the impact of such losses must be devastating.

In subsistence economies, at the level of individual family unit, foodborne disease can also be catastrophic. Debilitating illness at the time of planting or harvest may result in nearly total loss of crops not only for sale but also for family use.

In the last 40 years, international organizations have produced a large number of documents, technical reports and initiated many programmes to deal with this issue. Yet in spite of this effort, foodborne illness continues to increase in the world. The reasons for this are non well known, but may be associated with the relatively fragmented nature of the programmes, the difficulty of convincing national governments of its importance, and most significantly, the lack of recognition that the solution to the problem requires the coordination of a spectrum of skills including economics, sociology and anthropology as well as the more traditional disciplines associated with this issue. This situation stresses the need for international organizations to continue to expand their efforts to cooperate with member countries in food safety, taking into consideration their particular public health needs and foregoing difficulties and constraints in this complex field.

It was for this reason that this Committee was brought together to address these issues from as wide as possible a view of the problem. Because of the detailed evaluations of the problem incorporated in the large number of previous technical reports of FAO and WHO the Committee decided to concentrate on issues not previously well considered and on the development of a broad strategy useful to policy-

makers in constructing and developing international and national programmes.

In its discussion the Committee concentrated on a hazard evaluation designed to elucidate possible factors involved in the natural history of foodborne disease. It concentrated particularly on the cultural practices and economic pressures leading to increasing hazards associated with food. By so doing, the Committee believed that appropriate programmes could then be developed to modify these behaviours within the context of the prevailing culture and social conditions. The Committee also recognized that a single programme could not be constructed for all societies since states of economic and social development had to be primary determinants of any such programme.

To help in the establishment of this effort, the Committee proposed a strategy based on the accumulation of information; including research and technology, and interventions including evaluation. These in turn have been incorporated in a series of recommendations designed to facilitate the implementation of the strategy.

Certain points were emphasized in the strategy. First, that the solution to food contamination problems must be based on knowledge of culture and economic practice and on information concerning incidence and causes of the disease. Second, that both national and local interventions were needed and that well coordinated and rational legislation and regulations, rigorously enforced by trained, incorruptible officials were essential.

Furthermore, food safety must be an integral part of primary health care, and must be based on appropriate education and information for the public in general and mothers in particular. At the international level, coordination and common direction was essential not only between agencies but within each agency. While much could be done with existing knowledge and technology, substantial research was required to simplify and codify laboratory and other methods of investigation, on information collection as well as in the development of other complex technologies (e.g. irradiation) to the special problems of developing societies. The development of appropriate criteria for evaluation and the performance of such evaluations at all levels are central to the success of any programme.

The Committee emphasized that consideration of cost and benefit were essential at each point in the decision process. Further, the Committee also made clear that no conflict existed between the effort to provide enough food to populations and the effort to provide safe food. Indeed, it was clear, the programme to assure food safety could only result in increasing food supplies by decreasing losses due to spoilage and contamination.

Illness, and lack of wellbeing leading to reduce economic productivity due to contaminated food is one of, perhaps the most widespread, health problems in the contemporary world. The solution to this problem must be one of the major priorities of national and international health agencies and can only be successfully handled if the primary health care approach is being utilized. The Committee

believes that its report may help policy makers in developing appropriate national and international programmes to resolve this problem.

o o o o o o o o o

Aspetti epidemiologici sul ruolo degli alimenti nella trasmissione di malattie batteriche.

Dr. Donato Greco

Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica - I.S.S.

1. Avvertenze

Questo scritto raggruppa appunti per la lezione specificata in copertina. Non vuole essere quindi una completa trattazione sul tema, ma un supporto di lavoro per lo studente che si accinge ad applicare i metodi epidemiologici alle indagini sulle tossinfezioni alimentari. L'ultima parte include la proposta operativa per un primo passo per costruire un sistema nazionale di sorveglianza delle tossinfezioni alimentari; chi ne fosse interessato è pregato di contattare i punti di riferimento indicati.

2. Obiettivi di un'indagine epidemiologica

Perché eseguire indagini epidemiologiche? Non basta l'esame clinico-microbiologico degli alimenti e l'ispezione igienica?

Non basta; l'indagine epidemiologica è necessaria per tre obiettivi:

1. Prevenzione e controllo delle malattie
2. Conoscenza dell'etiologia e dell'epidemiologia della malattia
3. Raccolta di elementi per la programmazione degli interventi.

Nel nostro paese l'attuale sistema informativo sulle tossinfezioni alimentari non permette la costruzione di un adeguato quadro nazionale.

Molte volte sono le conseguenze gravi (qualche decesso) o quelle legali a mettere in luce un evento che altrimenti sarebbe passato inosservato; all'epidemia si risponde in modo drammatico e

spesso cieco: sequestri, antibiotici, disinfettanti ed isolamento sono le tre armi tradizionali che vengono drasticamente usate: all'epidemia fanno seguito riunioni, commissioni, relazioni, promesse di buone intenzioni e richieste di maggiori fondi alle autorità regionali.

Molto rara è l'indagine epidemiologica: in genere ci si ferma alla identificazione dell' "untore"; si isola un germe in un alimento, non necessariamente il colpevole, e si imputa tutto a lui.

E' invece noto che le epidemie di Tossinfezioni Alimentari (T.A.) non sono legate alla mera presenza di un virus o di un batterio, ma all'alterazione dell'equilibrio tra questi, l'ambiente e l'ospite; alterazioni sempre ricostruibili nell'ambito delle procedure e del personale che maneggia i cibi.

Gli alimenti non sono materiali sterili: la presenza di germi è normale e spesso benefica; la tossinfezione insorge perchè errori nelle procedure o nelle persone o nelle fonti di alimenti permettono la contaminazione e la moltiplicazione in dose patogena di agenti infettivi o di tossici chimici.

E' quindi indispensabile, a fronte di un'epidemia di T.A., non soltanto identificare l'agente, ma chiarire la fonte ed il modo di trasmissione.

In questa nota si tratteranno gli elementi basilari della indagine epidemiologica rimandando ai testi della letteratura per un maggiore approfondimento.

3. Definizione

Per epidemia si intende un numero di casi di una malattia in un certo tempo ed in un certo spazio che ecceda il numero atteso nello stesso tempo e spazio.

In assenza di una stima dei casi "attesi" è difficile definire un'epidemia; nel caso delle T.A. in Italia, l'assenza di conoscenze sull'endemia renderebbe impossibile il riconoscimento di un'epidemia.

Dovremmo quindi accontentarci della definizione di "clusters" spazio-temporali dello stesso tipo di infezione, per identificare

l'epidemia, lasciando all'epidemiologo il compito di verificarne la reale esistenza.

Per la verifica dell'epidemia, l'epidemiologo dovrà cercare di ricostruire la "linea di base" del fenomeno; se è chiamato per un numero insolito di isolamenti di una certa salmonella, dovrà cercare di sapere quante di quelle salmonelle sono state isolate negli ultimi 12 mesi.

4. Metodi di indagine

4.1. Il disegno

Lo studio limitato ai soli casi coinvolti nell'epidemia va senza dubbio escluso perchè non permetterà mai di identificare i fattori di rischio della malattia.

Lo studio sull'epidemia è sempre retrospettivo: il modello caso-con-trollo, quindi, sarebbe il tipo di studio ideale.

Si tratta di verificare la storia di esposizione dei casi a possibili fattori di rischio (esposizione a contagio, consumo di alimenti, ecc.) e di confrontare questa esposizione con quella della popolazione "sana".

Essendo impossibile indagare tutta la popolazione per ogni evento epidemico, si chiameranno a rappresentare questa popolazione un gruppo di "controlli" comparabili ai "casi", tranne che per la malattia (sono sani). Per essere sicuri che i controlli siano simili, per quanto riguarda caratteristiche personali o di comportamento ai casi (sarebbe inutile porre come controlli di una popolazione infantile un gruppo di adulti!) si userà la tecnica dell'appaiamento (Matching).

Si appaierà, cioè, ad ogni caso un controllo della stessa fascia di età, dello stesso sesso, della stessa residenza.

L'uso attento del Matching potrebbe purificare i controlli da errori sistematici; se sappiamo che l'età è un fattore rilevante nel rischio di ammalarsi (come lo è in molte malattie infettive), appaian-

do per fasce di età (caso e controllo, per esempio, nella stessa decade di età), eliminiamo un fattore che, se diverso tra casi e controlli, avrebbe potuto mascherare, nell'analisi, vere differenze attribuibili a reali fattori di rischio.

Purtroppo in molti casi vi sono ragioni che inducono a dubitare della reale possibilità di trovare controlli appaiati rappresentativi, nella stessa popolazione: infatti se da un lato non è semplice stabilire che il controllo sia suscettibile all'infezione e non ne sia stato colpito, dall'altro il caso è tale non solo perchè vittima di aggressione microbio-logica, ma spesso anche perchè particolarmente recettivo per disordini immunitari, spesso difficilmente documentabili.

Se si riuscisse ad ovviare a questi inconvenienti (ad esempio appaiando per età, sesso e reparto), il modello caso-controllo sarà senza dubbio da preferire agli altri.

Un'alternativa valida è costituita dal modello di coorte.

Definendo per coorte, ad esempio, tutti i partecipanti ad un banchetto, o tutti i consumatori di un cibo in un negozio in un determinato periodo di tempo.

Il confronto tra il tasso di attacco tra gli esposti al fattore rischio che noi sospettiamo associato all'epidemia, con il tasso tra i non esposti a questo fattore, può dirci se esiste o no associazione tra epidemia e fattore.

4.2 Cosa indagare

Va ricordato che per epidemia definiamo un evento "anormale"; quindi per trovare la fonte ed il modo di trasmissione dobbiamo andare ad indagare eventi "anormali" avvenuti intorno al periodo antecedente l'inizio del tempo di incubazione medio della malattia in questione, calcolato a partire dal picco centrale della curva epidemica. Un'epidemia di salmonellosi richiederà indagini relative al periodo che va, ad esempio, dal 10° al 2° giorno prima dell'epidemia, mentre un focolaio di epatite richiederà indagini mirate al periodo dalla 3° alla 5° settimana prima dell'epidemia.

E' importante, quindi, andare alla caccia di eventi speciali che possono aver causato l'anormalità epidemica.

L'attribuzione diretta di responsabilità a palesi irregolarità spesso costantemente presenti non è giustificata ed è fuorviante.

Non basta quindi dire che nel locale c'è poca pulizia, che gli operatori non si lavano le mani o che le tecniche di igiene non sono propriamente osservate se queste cose avvengono "normalmente".

Dobbiamo invece individuare eventi nuovi verificatisi nel periodo in studio; l'arrivo di alimenti infetti, cambi di procedure o di personale, etc.

Sostanzialmente conviene dedicarsi a ciò che è cambiato in quel periodo, piuttosto che elencare probabili fonti di infezioni sempre presenti.

4.3. Gli screenings

Tra le misure "cieche" che le epidemie di T.A. scatenano, sono frequenti gli screenings microbiologici o sierologici sugli alimentaristi e l'uso di massa di chemioprolasii.

E' forse superfluo ricordare quanto queste pratiche non hanno nulla a che vedere con le indagini epidemiologiche.

A meno che l'indagine stessa non richieda l'esecuzione di analisi batteriologiche, ad esempio per ricostruire la catena di trasmissione dell'infezione, tali indagini non vanno estese al di là dell'indispensabile clinico-diagnostico.

Vanno anzi fortemente scoraggiate perchè, oltre a creare facilmente false piste con l'individuazione di innocenti portatori sani, offrono al personale ed ai responsabili falsi sensi di sicurezza, distraendoli dalle preoccupazioni sull'epidemia.

Tra l'altro il rapporto tra colonizzazione e malattia, per molte T.A., non è ancora noto, così come difficili sono le relazioni ospite-agente, per cui informazioni sporadiche, scaturite da screening, sarebbero ben difficilmente utili alla conoscenza dell'epidemia.

5. Schema operativo per indagini sulle epidemie.

5.1. Definizione di caso

Dimostrare e verificare la diagnosi con criteri standardizzati (griglie diagnostiche, protocolli, ecc.).

5.2. Confermare l'esistenza di un'epidemia

Verificare dai dati preesistenti i casi attesi e confrontarli con gli osservati.

5.3. Caratterizzare l'epidemia per spazio, tempo e persona

Costruire una curva epidemica con le date di insorgenza dei sintomi, stimare il tempo medio di durata di malattia e di incubazione (moda, mediana); definire l'origine del picco epidemico; emettere ipotesi sulla fonte e sulla trasmissione.

E' fonte unica? Comune a tutti i casi? E' un contagio persona a persona? Vi è un caso indice? Vi sono picchi di casi secondari? Qual'è il tasso di attacco? Quale quello di età specifico e sesso specifico?

5.4. Identificazione della fonte e del modo di trasmissione

Alla luce delle notizie fin qui raccolte emettere ipotesi sulla fonte ed eventuale modo di trasmissione. Inserire a questo punto eventuali indagini ambientali o di altra natura per verificare le ipotesi formulate.

5.5. Identificazione della popolazione a rischio

Qual'è la popolazione che è stata realmente esposta a rischio?

Definire in modo standard i criteri di appartenenza o meno a questo gruppo. Definire la reale suscettibilità a rischio eliminando, anche sulla base di dati di laboratorio, quelli già immuni o protetti dal rischio.

5.6. Definizione del disegno di studio e raccolta dati individuali

Questa fase del lavoro non necessariamente segue la sequenza indicata: di volta in volta si deciderà quando l'informazione raccolta sarà sufficiente ad emettere ipotesi e quindi a scegliere il disegno di studio necessario per verificare questa ipotesi.

I disegni tradizionali dell'epidemiologia trovano applicazione nelle epidemie: il caso-controllo, lo studio di coorte, gli studi trasversali di prevalenza, gli studi prospettivi, ecc.

La patologia epidemica che generalmente ha frequenze modeste su grande numero di esposti, difficilmente offre utili applicazioni di studi prospettivi, mentre l'approccio retrospettivo sia caso-controllo che coorte, nella maggioranza dei casi si presta alle dimostrazioni del ruolo di fattori di rischio sulla malattia.

Gli studi di sieroepidemiologia invece utilizzano quasi sempre lo schema di prevalenza trasversale.

5.7. Raccolta dati

Un questionario, che verrà somministrato sia ai casi che ai controlli, sia ai malati che ai sani, sarà il supporto standardizzato di raccolta delle informazioni individuali. Un questionario precodificato semplifica l'elaborazione anche se questa è fatta manualmente.

Durante un'indagine epidemiologica sulle malattie acute sarà necessario ottenere dati da più fonti, oltre al questionario individuale: dati di laboratorio, cartelle cliniche, dati ambientali, atmosferici, ecc.

E' sicuramente importante rifiutare l'abitudine di "raccogliere" tutti i dati disponibili; va raccolto quanto è utile alla dimostrazione

dell'ipotesi formulata: non ha senso raccogliere informazioni che "potrebbero in futuro essere utili" quando si è già formulata una precisa ipotesi.

Questo è particolarmente vero nell'uso del questionario: la popolazione, specialmente quella coinvolta in un'epidemia, non accetta facilmente visite ed interviste; queste vanno quindi limitate soltanto ad informazioni utili all'epidemia in oggetto.

Va ricordato inoltre che i dati raccolti vanno utilizzati in forma sintetica: non vanno raccolte quindi informazioni che hanno una frequenza troppo bassa per essere utilmente tabulate.

6. Studio di un'epidemia

6.1. Descrizione

L'analisi dei casi secondo i criteri di spazio, tempo e persona già menzionati, permetterà di ottenere un quadro della situazione epidemica indispensabile alla formulazione di ipotesi.

La lettura della curva epidemica (un semplice istogramma con il numero dei casi rispetto al tempo in cui si sono manifestati), può da sola fornire utili indicazioni per comprendere il modo di trasmissione e la fonte dell'epidemia.

Infatti l'esposizione ad un'unica fonte infettante porterà, dopo il tempo di incubazione, ad un unico "picco" epidemico, mentre un contagio da persona a persona, o da fonte persistente porterà ad una curva più appiattita. La conoscenza del tempo di incubazione della malattia permette una lettura della curva epidemica molto più approfondita: può permettere l'identificazione del caso indice (il caso da cui scaturiscono gli altri casi), e può far "mirare" l'indagine sul contagio nell'esatto periodo in cui questo è avvenuto (stimato sottraendo al punto centrale del picco epidemico il tempo di incubazione medio).

E' essenziale che la curva epidemica non sia costruita con le

date di notifica dei casi, ma con le date di insorgenza della sintomatologia infettiva per ogni caso.

6.2. Denominatori

Lo strumento più potente nell'analisi di un'epidemia di T.A. è il tasso di incidenza, definito dal rapporto tra numero di nuovi casi di infezione e popolazione a rischio. Una volta definiti chiaramente i casi non vi saranno problemi per il numeratore: problemi sorgono invece nella definizione del denominatore. Chi è la popolazione a rischio di infettarsi? in che periodo? come la identifichiamo?

Se il nostro episodio riguarda una particolare cena in un ristorante il denominatore sarà composto da tutti coloro che hanno partecipato a quella cena; se sospettiamo un'epidemia a fonte idrica dovremo includere nel denominatore tutta la popolazione che fa uso di quel sistema idrico;

6.3 L'analisi

I tassi più usati nello studio dell'epidemie sono i tassi di attacco (tassi di incidenza percentuali): questi saranno specifici (età specifici, mansione specifici, cibo specifici, ecc.); la specificità dei tassi permette infatti di valutare il peso di singoli fattori di rischio, confrontando i tassi di attacco tra gli esposti e i non esposti al fattore stesso.

Se per esempio vogliamo evidenziare il ruolo di un particolare alimento (dolce alla crema) tra i clienti di un ristorante, dovremo avere il seguente schema:

	Infettati	Non infettati	Totale
Hanno mangiato il dolce	A	B	A + B
Non hanno mangiato il dolce	C	D	C + D
Totale	A + C	B + D	

Il tasso di attacco per i clienti che hanno mangiato il dolce sarà dato da:

$$A/A+B \%$$

E' evidente che, da solo, questo tasso non "incrimina" il dolce, anche se è alto; per poter dimostrare il ruolo del fattore di rischio dovremo confrontare questo tasso con il tasso di infezione tra clienti che non hanno mangiato il dolce; dato da:

$$C/C+D \%$$

Infatti l'origine dell'infezione potrebbe risiedere in un altro alimento, per cui l'alto tasso di infezione tra i mangiatori di dolce non è altro che lo stesso tasso degli altri clienti del ristorante.

Nel caso, invece, che la differenza tra i due tassi sia statisticamente significativa, si può concludere che il fattore di rischio è associato con l'infezione.

L'associazione dimostrata non è dimostrata come "causale" ma semplicemente come associata: nel caso precedente potremo soltanto concludere che il dolce è associato con l'epidemia, ma non che il dolce è "causa" dell'epidemia.

Perchè sia dimostrata la differenza tra i due tassi (mangiatori e non mangiatori) è indispensabile usare test statistici.

Nell'esempio su dimostrato si userà il metodo del χ^2 , appositamente costruito per tabelle di questo tipo.

Una stima del rischio di infettarsi che abbia il paziente che abbia mangiato il dolce, potrà essere dato dal Rischio Relativo; definito come il rapporto tra il tasso di incidenza negli esposti ed il tasso di incidenza nei non esposti, nel nostro esempio:

$$RR = \frac{A/A+B}{C/C+D}$$

I fattori di rischio non hanno mai un ruolo indipendente nelle T.A.; per cui esisteranno spesso più fattori che concorrono all'evento ed ancora più fattori saranno combinati tra di loro.

Per evidenziare il "peso" che il nostro fattore di rischio ha nel determinismo dell'infezione possiamo usare il Rischio Attribuibile; definito come la differenza percentuale tra l'incidenza di infezione negli esposti e l'incidenza dell'infezione nei non esposti.

Nel nostro esempio:

$$RA = \frac{A}{A+B} - \frac{C}{C+D} \%$$

E' evidente che il modello di analisi appena discusso si applica a studi ove è possibile stimare l'incidenza del fenomeno, cioè gli studi di coorte.

Non è applicabile agli studi caso-controllo in cui andiamo a cercare l'esposizione al fattore in casi e controlli; per cui potremo parlare di "incidenza" del fattore di rischio e non dell'infezione.

Per stimare il Rischio Relativo quindi usiamo un'approssimazione matematica, detta Rapporto Incrociato.

Nel nostro esempio:

$$RI = \frac{A \times D}{B \times C}$$

Anche in questo caso l'associazione tra esposti e fattore non è necessariamente causale, e la bontà del risultato dipenderà dall'accuratezza con cui sono stati definiti i casi della comparabilità dei controlli con i casi.

7. Un possibile schema per la relazione di un'indagine su un'epidemia

A conclusione di un'indagine epidemiologica sarà indispensabile redigere un rapporto; se ne presenta uno schema.

- I. Titolo
- II. Autori
- III. Sintesi
- IV. Testo

1. Introduzione

1.1. Retrosceña

Notizie essenziali sulla segnalazione del problema e sul coinvolgimento degli autori della relazione (1 paragrafo)

1.2. Orientamento

Descrizione molto sintetica del luogo dell'indagine tenendo conto di quanto già a conoscenza dei probabili lettori della relazione (1 paragrafo)

2. Materiali e metodi

2.1. Definizione di un caso

Esplicita, obiettiva, operativa ed applicata in modo omogeneo. non da confondere con una descrizione dei casi scelti.

2.2. Metodo di accertamento dei casi

Esplicito, obiettivo, operativo e completo.

2.3. Metodi di raccolta ed analisi di informazioni

2.4. Metodi di raccolta ed analisi di prelievi clinici

2.5. Metodi di raccolta ed analisi di prelievi ambientali

2.6. Altri punti metodologici particolari

2.7. Tecniche della statistica e dell'informatica usate

3. Risultati

3.1. Numero di casi e frequenza di sintomi, segni, e risultati anormali di laboratorio rilevanti

3.2. Epidemiologia descrittiva

3.2.1. Andamento del fenomeno nel tempo e curva epidemica

3.2.2. Localizzazione del fenomeno

3.2.3. Caratteristiche delle persone coinvolte (età, sesso, ecc.)

3.3. Epidemiologia analitica

- 3.3.1. Ipotesi eziologiche
- 3.3.2. Ipotesi sulle fonti
- 3.3.3. Ipotesi sui modi di trasmissione
- 3.3.4. Altre ipotesi speciali
- 3.4. Risultati speciali diagnostici
- 3.5. Risultati speciali ambientali
- 4. Discussione
 - 4.1. Precedenti dalla letteratura
 - 4.2. Conclusione dell'indagine
- 5. Raccomandazioni alle autorità competenti
 - 5.1. Misure preventive
 - 5.2. Misure terapeutiche
 - 5.3. Sistemi di sorveglianza
 - 5.4. Altre raccomandazioni
- V. Riconoscimenti di aiuto ed appoggio nell'indagine
- VI. Bibliografia

Nota per l'avvio di un sistema di sorveglianza
delle tossinfezioni alimentari in Italia.

Dr. Donato Greco

Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica - I.S.S.

1. Introduzione

Nel nostro Paese ogni anno sono segnalate alcune migliaia di casi di tossinfezioni alimentari (dati ISTAT). Sono segnalati oltre diecimila isolamenti l'anno di salmonelle. Circa quattromila l'anno sono i casi di tifo. Almeno 5 milioni l'anno sono le stime di gastroenterite.

Purtroppo a monte di una così ampia fascia di patologia, seppure sommariamente stimata, non si dispone dell'informazione epidemiologica sufficiente a delineare il ruolo degli alimenti su tanta patologia umana.

La recente trasformazione, inoltre, dei servizi di sanità pubblica ha portato un inevitabile disorientamento degli operatori, con ulteriore danno al sistema informativo.

Queste considerazioni spingono a considerare la possibilità di avviare un lavoro che porti alla costruzione di un funzionale e moderno sistema di sorveglianza delle tossinfezioni alimentari (TA).

2. Obiettivi

Obiettivi di questo sistema sono:

- 2.1 Prevenire e controllare le TA.
- 2.2 Conoscere l'etiologia e l'epidemiologia delle TA.
- 2.3 Ottenere informazioni per la pianificazione degli interventi.
- 2.4 Valutare l'effetto delle misure prese sull'andamento del fenomeno.

E' evidente che questi obiettivi non possono essere immediata-

mente raggiunti, ma devono essere considerati obiettivi "a regime", postulando diverse fasi del programma.

E' anche vero che non si parte da zero: nel Paese esiste una ricca e forte tradizione di impegno sulle TA, con esperienze molto valide e funzionanti.

Un primo obiettivo a medio termine potrebbe essere quindi quello di costruire un sistema informativo volontario a livello nazionale basandosi sull'esistente: sulle strutture già operanti e sulle informazioni che sono raccolte routinariamente.

3. Metodi

Lo schema della Figura 1 mostra un possibile flusso dell'informazione.

In caso di segnalazione di sospetta TA la USL o il Servizio agirà come usualmente fa; i provvedimenti amministrativi seguiranno l'abituale routine.

L'unica novità consisterà nel segnalare l'episodio all'Istituto Superiore di Sanità (ISS), Centro del coordinamento nazionale, attraverso un'apposita scheda che verrà compilata alla fine dell'indagine epidemiologica.

L'uso di moderne tecniche epidemiologiche nell'indagine di episodi di TA non è obbligatorio ma viene fortemente raccomandato: soltanto con una corretta applicazione di metodi epidemiologici è possibile ottenere informazioni scientificamente valide sulle cause dell'epidemia.

Allo scopo di favorire l'omogeneo uso di queste tecniche, si allestiranno specifici protocolli di indagini epidemiologiche. Per lo stesso motivo è disponibile l'assistenza in loco di epidemiologi dell'ISS secondo le abituali modalità.

3.1 La scheda

La scheda prevista raccoglierà la sintesi dell'indagine: la

prima parte riguarderà l'epidemiologia (si sottolinea l'esigenza di raccogliere l'anamnesi alimentari sia per i casi, che per coloro che hanno mangiato lo stesso cibo, ma non si sono ammalati).

La seconda parte raccoglierà la sintesi dei dati di laboratorio.

Sarà gradita, comunque, ogni segnalazione anche se non fosse possibile dimostrare l'etiologia alimentare per via epidemiologica e/o microbiologica.

3.2 La restituzione dei dati

Il sistema di sorveglianza è volontario e riservato. Saranno invitati ad aderire: i Presidi Sanitari Pubblici che vengono a contatto col problema per competenza d'ufficio.

Presso il Centro di coordinamento nazionale sarà costituito un archivio computerizzato, permanentemente interrogabile su richiesta dei partecipanti al sistema purché ne venga fatta richiesta scritta (sono escluse le informazioni di identificazione).

Resoconti trimestrali saranno pubblicati su uno speciale numero del Bollettino Epidemiologico Nazionale (BEN) che settimanalmente raggiunge circa quattromila punti del Servizio Sanitario Nazionale.

Tutti i partecipanti al sistema saranno d'ufficio e gratuitamente abbonati al BEN.

Il BEN sarà lieto di ospitare contributi, segnalazioni epidemiche o altro materiale di interesse epidemiologico e microbiologico sulle affezioni da alimenti che singoli autori vogliano inviare, previo contatto diretto con la redazione.

3.3 Riservatezza dei dati

Saranno escluse da ogni analisi o interrogazione le informazioni che permettono di identificare le persone, le istituzioni, le ditte, gli esercizi che hanno inviato le schede o sono risultate coinvolte in episodi di tossinfezione.

Ove i singoli partecipanti lo vogliano, potremo segnalare con

breve nota episodi epidemici sotto propria responsabilità sul BEN.

L'accesso ai dati sarà ammesso soltanto ai partecipanti ed alle autorità di ufficio competenti nel settore.

FOCOLAI DI CONTAMINAZIONE MICROBICA DURANTE LA LAVORAZIONE
DI PRODOTTI ALIMENTARI DI ORIGINE ANIMALE

Prof. C. Cantoni, Dott.ssa S. d'Aubert, Dott.ssa C. Bersani
Istituto di Ispezione degli alimenti di origine animale
Università degli studi di Milano
Facoltà di Medicina Veterinaria

CARNI E PRODOTTI DERIVATI

Caratteristiche fondamentali

L'Aw è il fattore principale della conservabilità degli alimenti. La carne fresca ha un elevato contenuto d'acqua corrispondente ad una Aw di 0,99 - 1,00 che è favorevole allo sviluppo di tutti i microrganismi, ad eccezione degli alofili.

La carne contiene acqua in quantità pari a circa il 75% e in questa sono disciolte una certa quantità e varietà di sostanze nutritive, di conseguenza la carne è un ottimo terreno di crescita per i microrganismi che la contaminano, soprattutto i batteri.

Lo sviluppo dei microrganismi nella carne avviene soprattutto a carico dei costituenti solubili come i carboidrati, l'ac. lattico, gli aminoacidi, i composti azotati quaternari.

Una idrolisi significativa delle proteine strutturali non è mai stata riscontrata durante la degradazione della carne.~

Un secondo fattore da cui dipende la conservabilità della carne è il potenziale redox.

Quando, dopo la morte dell'animale, cessa l'apporto di ossigeno al tessuto muscolare o ai parenchimi, in seguito all'arresto della circolazione sanguigna, il contenuto di ossigeno logicamente diminuisce e così il potenziale redox del substrato con formazione per via anaerobica di ac. lattico.

L'acidità sviluppata si inibisce ulteriormente il metabolismo muscolare che, tuttavia, continua per parecchi giorni dopo la morte, anche alla temperatura di refrigerazione.

Tranne una porzione superficiale, non superiore ai pochi millimetri di penetrazione dell'ossigeno ambientale a contatto con la superficie carnea, la parte più interna diventa anaerobica entro poche ore dalla morte. Di conseguenza mentre sulla superficie si sviluppano solo germi aerobi o aerobi-anaerobi facoltativi, nella parte interna possono moltiplicarsi solo gli anaerobio-facoltativi o quelli obbligati.

Quando la carne è porzionata o tritata allora si ristabili

scono delle condizioni aerobiche, mentre se viene confezionata, si riformano condizioni d'anaerobiosi.

La flora microbica presente riflette allora le variazioni del condizionamento subito dall'alimento carneo.

Il pH della carne, terzo fattore importante per la conservazione, può variare naturalmente da 7,0, che è un pH ottimale per lo sviluppo dei germi saprofiti e patogeni, fino a 5.

Valori di pH prossimi a 5,5 da soli o in combinazione con altri, possono rallentare o inibire lo sviluppo batterico che non è comunque totalmente soppresso perchè, sia gli Pseudomonas, che delle Enterobacteriaceae e delle Lactobacillaceae possono svilupparsi.

Le quantità di ac. lattico dipendono da quelle iniziali di glicogeno presenti nel muscolo o nei parenchimi prima della morte. Il valore di pH può essere alto se la carne proviene da animali stancati prima dell'abbattimento (carni D.F.D.).

In un muscolo riposato, quasi tutto il glicogeno presente viene trasformato in acido lattico dopo la morte e il pH si aggiusta intorno al valore di 5,5.

Tra particolari animali, soprattutto suini, suscettibili allo stress, il glicogeno muscolare viene rapidamente idro-

lizzato, il pH cade rapidamente ed il tessuto muscolare cambia velocemente di colore ed emette acqua (P.S.E.).

Metodi di conservazione

La carne è un alimento facilmente deperibile e i microrganismi vi si possono moltiplicare rapidamente rendendola incommestibile, o talvolta, addirittura pericolosa. Sono stati quindi messi a punto diversi sistemi di conservazione:

Refrigerazione:

- 1) carcassa
- 2) tagli freschi
- 3) tagli sottovuoto
- 4) carne trita

Congelazione

Surgelazione

Essiccamento

Salagione

Flora iniziale

Ad eccezione della superficie esterna, del tratto gastro-intestinale e del tratto respiratorio, i tessuti degli animali sani non contengono o contengono solo pochi micror-

ganismi.

La salute degli animali e il loro stato di pulizia della mattazione dipendono da fattori ambientali di allevamento e sanitari.

La carne, dopo l'abbattimento dell'animale, si contamina per contatto: con la pelle, le mani degli operatori, attrezzi, utensili, con acqua di lavaggio.

La composizione della flora della carne riflette le varie fonti di contaminazione e l'efficacia delle norme igieniche nelle quali viene eseguita la mattazione.

Le principali lavorazioni della carne consistono nella macellazione, nella sezionatura, nella porzionatura e nel raffreddamento.

La prima fonte importante di contaminazione della carne è rappresentata dalla cute dell'animale.

La contaminazione batterica della cute comprende la flora autoctona (stafilococchi, streptococchi, corineformi) e i batteri di origine tellurica e fecale.

Altre fonti di contaminazione durante la tolettatura delle carcasse sono gli attrezzi, gli utensili, il vestiario, le mani dei lavoranti e l'acqua usata per il lavaggio delle carcasse.

Alcuni microrganismi di origine umana raggiungono la carne

tramite queste vie ma, se si mantiene un ragionevole standard igienico di lavorazione, la contaminazione da queste fonti è trascurabile rispetto a quella costituita dall'animale in se stesso.

Sono stati fatti dei tentativi per diminuire la carica batterica delle carcasse ma senza successi tangibili; tuttavia dei trattamenti spray, almeno sperimentalmente, hanno permesso di ottenere dei risultati lusinghieri.

Il livello di contaminazione delle carcasse è di solito più basso entro le cavità che sulle superfici esterne.

La pratica di rimuovere le ossa della carcassa prima della refrigerazione (dissanguamento a caldo) permette una refrigerazione più rapida e una minore moltiplicazione batterica. Ma, in pratica, questa modalità di preparazione delle carni, deve essere effettuata con cura per evitare, se si adottano modalità non igieniche, una contaminazione più elevata di quanto non avvenga operando normalmente.

L'effetto della refrigerazione sulla flora batterica dipende da diverse situazioni.

La refrigerazione rapida a basse temperature con elevata velocità dell'aria e con bassa umidità può ridurre la carica batterica.

In condizioni meno rigorose, si può verificare lo sviluppo

di psicrotrofi che possono così modificare la loro percentuale rispetto ai mesofili.

Se le carcasse sono lasciate raffreddare a temperatura ambiente di 15-20°C possono moltiplicarsi i mesofili, compresi i germi patogeni.

I visceri edibili sono contaminati più massicciamente delle carni e devono essere refrigerati immediatamente.

Il livello di contaminazione delle carni durante il dissossamento, il sezionamento e l'imballaggio dipendono dalle situazioni igieniche locali.

La carne viene maneggiata frequentemente durante queste operazioni e le superfici delle carni fresche sono esposte a tutte le contaminazioni.

Fattori importanti sono la temperatura delle carni e del locale di lavorazione, il tempo impiegato e lo stato igienico delle superfici da taglio, i coltelli, le superfici delle mani, dei tavoli e di altri utensili.

Una sala di lavorazione deve avere una temperatura non superiore a 10°C, la carica microbica aerea deve essere minimizzata e non deve moltiplicarsi.

La fonte principale di contaminazione delle carni è la superficie delle carcasse e la velocità alla quale questa contaminazione si distribuisce sulle superfici tagliate da

poco in seguito al contatto con gli utensili può avere un effetto importante sulla conservabilità della carne.

I germi presenti sulle superfici di utensili inadeguatamente sanificati sono, per la maggior parte psicrotrofi.

I prodotti che subiscono molteplici manipolazioni da parte di operatori si contaminano con germi di origine umana.

Per esempio, vi sono prove esaurienti che la proporzione di ceppi di stafilococchi umani presenti nei prodotti carnei aumenta durante le lavorazioni. Talvolta sono stati trovati virus enterici probabilmente di origine umana.

Nella carne preparata igienicamente il numero di patogeni è molto piccolo e la flora presente consta specialmente di specie saprofitarie. I germi più numerosi sono micrococchi e bastoncini gram negativi. Tra questi vi sono:

Acinetobacter, Aeromonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Moraxella, Pseudomonas e varie enterobacteriaceae. Sono anche presenti corineformi. I cocchi presenti sulle carcasce refrigerate sono micrococchi e stafilococchi. Gli streptococchi sono presenti in scarsa quantità.

I lattobacilli, il B. thermosphacta, e varie specie di bacilli sono presenti inizialmente in scarsa quantità. Lieviti e muffe lo sono anche se derivano dall'ambiente esterno.

L'importanza dei vari tipi di germi inizialmente presenti sulla carcassa dipende dall'uso seguente del prodotto.

Pseudomonas, Acinetobacter-Moraxella sono la flora predominante della carne non trattata ed esposta all'aria alla temperatura di refrigerazione.

Se la superficie si essicca, i lieviti e le muffe sostituiscono batteri.

Se la carne è confezionata con esclusione dell'aria circostante, il B. thermosphacta o dei lattobacilli atipici possono prevalere.

Nessuno di questi microrganismi è importante per la conservabilità della carne congelata a meno che sia scongelata scorrettamente.

I germi psicrotrofi sono sensibili al calore e quindi non sopravvivono ai trattamenti termici.

Vi è una relazione diretta fra il numero iniziale di batteri sulla carne e il momento in cui s'inizia la degradazione. Inoltre, se il numero iniziale è troppo elevato, la durata del colore, dell'aroma, anche allo stato di congelazione possono essere compromessi.

I germi patogeni che si possono trovare sono salmonelle, stafilococchi aurei, Y. enterocolitica, Cl. perfringens e, occasionalmente Cl. botulinum. Microrganismi enterici co-

me i coliformi fecali e gli streptococchi fecali si trovano frequentemente nella carne indicando, appunto, che l'intestino è una fonte comune di contaminazione. Possono essere presenti anche certi virus enterici.

In appropriate condizioni di temperatura, la maggior parte dei microrganismi di origine intestinale può moltiplicarsi prontamente nella carne e nel materiale di scarto nei macelli, cosicchè, dissimilmente da ciò che si ritiene per l'acqua, il loro numero fornisce dati igienici che devono essere interpretati con cognizione di causa. Ad esempio, la presenza di enterobatteri psicrotrofi non ha alcun significato come indice di contaminazione fecale.

Le salmonelle rappresentano il principale problema di carattere igienico.

Gli episodi gastroenterici da carni contaminate da salmonelle sono i più frequenti nei vari paesi e sono sostenuti dai sierotipi più diversi.

I mangimi per animali rappresentano le principali fonti di contaminazione. Da qui le salmonelle pervengono nell'intestino degli animali da macello e, dopo la macellazione, possono contaminare le carni e gli ambienti di lavorazione.

Tutti i provvedimenti igienici moderni sono incapaci di ri

muovere o di diminuire la contaminazione crociata da salmo nelle.

La negligenza delle norme igieniche oggi consigliate può tuttavia peggiorare la situazione.

Attualmente, la presenza di salmonelle nei prodotti carnei può essere frequente.

La soluzione sta nell'adottare dei trattamenti che distruggano le salmonelle nei mangimi e nella produzione di animali esenti.

Uno scarso numero di stafilococchi è normalmente presente nelle carni. Il loro numero può diventare pericoloso quando viene resa possibile la moltiplicazione in seguito alla conservazione della carne a temperature favorevoli per la loro crescita.

Mediante la tipizzazione fagica e le caratteristiche biochimiche è possibile distinguere i ceppi di origine animale da quelli di origine umana.

In base a questi principi classificativi, i "tipi" animali risultano prevalere sulle carcasse subito dopo l'abbattimento, mentre i tipi umani predominano nella carne e nei cibi lavorati.

Se la carcassa è esposta alla temperatura di circa 20°C, molti batteri mesofili possono crescere. Per esempio, i

clostridi possono moltiplicarsi nel tessuto muscolare e causare una putrefazione di tipo anaerobico con possibile sviluppo anche di clostridi patogeni che potrebbero raggiungere una quantità pericolosa. Si può anche verificare un notevole sviluppo di streptococchi fecali prima della crescita dei clostridi: anche le enterobacteriaceae possono svilupparsi.

La flora batterica delle carni conservate a 10°C-20°C comprende enterobatteri, micrococchi, stafilococchi, Pseudomonas, Acinetobacter-Moraxella ed Aeromonas.

E' desiderabile la refrigerazione rapida delle carcasse alle temperature di frigorifero al di sotto di 10°C, preferibilmente alle temperature intorno a -1 +3°C.

Se la refrigerazione è eseguita correttamente l'interno della carne contiene pochi batteri e solo quei generi che non si moltiplicano alla temperatura di frigorifero; quindi, durante la refrigerazione, i cambiamenti microbiologici importanti avvengono in superficie.

Quando la carcassa è tenuta a temperature inferiori a 10°C le condizioni aerobiche, l'elevata Aw e la bassa temperatura selezionano i batteri psicrotrofi.

Una flora costituita da Pseudomonas, Acinetobacter, Alcaligenes e di Moraxella predomina durante la conservazione

ed il numero dei microrganismi aumenta. Nelle carni di pesce e di pollo è presente un altro gruppo di microrganismi costituiti da Alteromonas putrefaciens, che è molto attivo nella degradazione del pesce.

Ai fini della moltiplicazione microbica l'Aw svolge un ruolo importante se l'RH dell'atmosfera ambiente è inferiore all'80% e se vi è un movimento di aria.

La moltiplicazione di molti germi degradanti le carni è pure influenzata dalla variazione naturale del pH della carne, compreso tra 5,5 - 7.

L'effetto del pH è più evidente nei grossi pezzi di carne piuttosto che in quelli di minori dimensioni.

L'uso del 15% di CO₂, nell'atmosfera circostante la carne, raddoppia a 0°C il tempo di replicazione dei gram negativi, ma è meno efficace alle temperature più elevate.

Dopo un certo periodo di tempo l'attività metabolica dei germi diventa avvertibile ai sensi. La superficie della carne si decolora e incomincia a puzzare. Poi si sviluppano vischiosità. I segni della degradazione batterica diventano evidenti quando il numero di germi raggiunge $10^7/\text{cm}^2$ di superficie.

Tra i vari test chimici proposti per valutare lo stato di conservazione della carne il dosaggio dell'azoto basico vo

latile è quello più attendibile.

Anche la determinazione dello stato di idrolisi dei grassi può dare indicazioni sullo stato di conservazione soprattutto quando si devono valutare dei cibi ricchi di grasso. I casi più frequenti di intossicazioni da carni sono sostenuti oltre che dalle salmonelle da Cl. perfringens e da Staph. aureus.

Poiché i membri dei generi Pseudomonas, Alcaligenes, Acinetobacter e Moraxella non sono patogeni e poiché il loro sviluppo non è favorevole a quello dei patogeni la loro determinazione quantitativa non fornisce indicazioni per la salute pubblica; ma vale solo per individuare lo stato di conservazione.

Mantenendo la carne a temperature inferiori a 10°C, il numero dei patogeni presenti tende a diminuire.

Una tecnica di conservazione molto diffusa è quella che ab**u**na la refrigerazione al confezionamento sottovuoto in sacchi di materiale plastico impermeabili.

Questa tecnica presenta vantaggi di ordine igienico, conserva le caratteristiche organolettiche e consente di conservare più a lungo la carne perché in queste condizioni non si sviluppa la flora deteriorante.

Entro un imballaggio sottovuoto, l'ossigeno residuo viene

consumato più o meno velocemente dalla respirazione tessutale ed è sostituito dalla CO_2 che effettivamente raggiunge un'elevata pressione parziale dentro il limitato spazio disponibile. In queste condizioni prende il sopravvento la flora batterica lattica. Talvolta si può riscontrare un'alterazione tipica caratterizzata dalla formazione nell'imballaggio di un odore simile al formaggio per la presenza di acidi grassi a corta catena (C_2-C_6).

Per le carni sottovuoto è difficile scegliere un test chimico che segnali la degradazione muscolare. Quando le condizioni di anaerobiosi sono incomplete si possono moltiplicare i Gram negativi che producono alterazioni chimiche caratterizzate dalla produzione di H_2S , di trimetilammina e di acidi grassi volatili come l'ac. butirrico, l'ac. acetico che derivano dagli aminoacidi.

L'imballaggio sottovuoto non presenta possibilità di sviluppo per i patogeni.

La microbiologia dei tagli carnei sezionati è simile a quella delle carcasse. La composizione del substrato e le variazioni batteriche sono praticamente le stesse; a causa delle maggiori manipolazioni la contaminazione può essere maggiore.

Le condizioni batteriologiche dei vari tagli carnei dipen-

de dalle manipolazioni precedenti cui è stata sottoposta la carcassa.

Se i tagli carnei sono stati preparati velocemente e igienicamente, e provengono da una carcassa refrigerata prontamente, il numero dei germi può essere molto basso, inferiore a 100 g/cm^2 .

Se invece i tagli sono ricavati da carne raffreddata lentamente, con ritardo e senza particolari provvidenze igieniche, le conte possono superare i 10^6 g/cm^2 , e la vita commerciale si accorcia; questa situazione si verifica nei negozi di macelleria.

Le condizioni batteriologiche iniziali possono comunque, dipendere ancora di più dalle modalità di lavorazione.

Quando il sezionamento è effettuato in condizioni igieniche, la conta totale raramente aumenta di 10 volte, ma maggiori incrementi si verificano se i coltelli sono contaminati, se lo sono le tavole di sezionamento, le macchine affettatrici ed i vari utensili.

In molti paesi il sezionamento della carcassa in tagli, deve avvenire a temperature non superiori a 10°C o a 7°C .

I tagli carnei hanno un rapporto tra superficie e volume estremamente elevato ed hanno una maggiore superficie esposta.

Se i tagli carnei sono esposti senza precauzioni speciali, l'evaporazione è rapida e le qualità organolettiche sono peggiorate a causa dello scadimento del colore e della lucentezza.

Per queste ragioni è pratica comune proteggere i tagli di carne con un involucro trasparente che mantenga un'elevata umidità sulla superficie della carne.

Per mantenere i pigmenti della carne allo stato ossigenato e per conservare il colore rosso brillante, si usa generalmente un film permeabile all'ossigeno. In queste circostanze gli Pseudomonas, Acinebacter, Moraxella, si sviluppano e causano la degradazione.

Per aumentare la conservabilità dei tagli carnei si può conservarli in atmosfera modificata contenente CO_2 mantenendola alla temperatura di refrigerazione.

L'alterazione dei tagli carnei è simile a quelle delle carcasse.

Sulla carne tenuta all'aria o avvolta in films permeabili predominano gli pseudomonadi non pigmentati.

Nelle carni confezionate sottovuoto è presente la flora di tipo lattico.

L'alterazione della carne è causata dalla formazione di odori particolari costituiti chimicamente da H_2S , etanolo,

acetaria ed esteri etilici di acidi grassi a corta catena, ammine ecc.

Questo processo alterativo è denominato impropriamente putrefazione, ma è differente da questa che è provocata in condizioni anaerobiche da vari clostridi moltiplicatisi a temperatura ambiente.

Le specie patogene rinvenibili nei tagli carnei sono le stesse che si trovano sulle carcasse.

La carne trita o a pezzetti è più deperibile di quella in grossi pezzi a causa della presenza di una maggiore quantità di succo muscolare e perchè i microbi, dalla superficie, durante il tritamento, si distribuiscono nella massa. La contaminazione dei tagli carnei destinati alla tritatura avviene durante il loro sezionamento e la macchina tritatrice provvede alla loro distribuzione nella massa carnea tritata finemente.

Nella carne fresca tritata, la flora composta principalmente da micrococcaceae da lattobacilli, Pseudomonas ed enterobatteri.

La carne trita con una elevata carica batterica iniziale si deteriora rapidamente durante la conservazione all'aria in 28-48h, il suo colore cambia rapidamente e l'aroma peggiora.

E' pratica comune, anche se proibita, aggiungere SO_2 in concentrazione pari allo 0,05% per conservare il colore.

Il solfito restituisce la colorazione rossa alla carne anche dopo che la carne viene degradata organoletticamente.

Il solfito esercita un effetto inibitorio sugli Pseudomonas, nei confronti delle Enterobacteriaceae ed in particolare delle salmonelle.

L'effetto è maggiore a pH acido.

La degradazione può avvenire aerobicamente o anaerobicamente. Sulla superficie della carne tritata, le condizioni sono aerobiche e il colore è rosso brillante; all'interno le condizioni sono anaerobiche ed il pigmento della carne si riduce.

Sulla superficie si sviluppano i germi gram negativi aerobici ed all'interno i lattici.

Il processo alterativo delle carni trite è simile a quello delle carni integre o a quello dei tagli carnei.

Fra i germi contaminanti le carni trite ve ne sono dei patogeni come il Cl.perfringens, le salmonelle e dei virus.

Carne congelata fresca

Il numero dei batteri sulla carne può venire aumentato dalla contaminazione durante la preparazione e le operazioni

di congelamento. Comunque il congelamento della carne uc
cide una piccola quantità di tutti i germi presenti; un nu
mero maggiore muore durante la conservazione allo stato
congelato. Ma la morte avviene piuttosto lentamente al-
la temperatura di circa -20°C . I bastoncini Gram negati-
vi sono più suscettibili dei cocchi Gram positivi, le spo-
re rimangono inalterate e le cellule vegetative del Cl.
perfringens muoiono rapidamente. Nonostante questa di-
struzione i livelli batterici possono tuttavia essere ele-
vati.

Le condizioni di congelamento sono molto importanti spe-
cialmente se tempo e temperatura non sono controllate at-
tentamente. Sono richiesti lunghi periodi di tempo per
congelare la carne, specialmente se in grossi pezzi.

Se viene usata acqua calda per accelerare lo scongelamen-
to, si creano condizioni favorevoli per lo sviluppo micro-
bico. Per evitare questo si deve scongelare a bassa tem-
peratura anche se in queste condizioni possono svilupparsi
degli psicrotrofi.

Per queste ragioni la carica microbica di solito aumenta
da 10 a 100 volte durante i processi commerciali di sconge
lamento.

Vi sono poche differenze tra lo scongelamento all'aria o

in acqua ma non è desiderabile usare temperature al di sopra di 10°C.

E' stato affermato che la carne congelata è più deperibile di quella fresca mai congelata, specialmente perchè il succo che fuoriesce dalla carne congelata potrebbe costituire un terreno favorevole allo sviluppo microbico. In realtà lo sviluppo dei microrganismi sulla carne congelata non è fondamentalmente diverso da quanto avviene su carne mai congelata.

Se la carne è congelata e conservata con proprietà, non viene degradata dai microrganismi, ma sono possibili due errori di lavorazione.

Il primo consiste nella esposizione alle temperature nell'intervallo tra -5°C e -10°C con conseguente possibilità di sviluppo di muffe che procurano macchie come il Cladospodium herbarum il quale dà luogo a piccole macchie nerastre.

Usualmente la carne contaminata non emana particolari odori.

Il secondo errore di lavorazione può verificarsi se un'elevata carica batterica si sviluppa prima del congelamento, la carne può degradarsi lentamente durante lo scongelamento.

Sebbene questi microrganismi non possono moltiplicarsi quando sono allo stato congelato e gradualmente perdono la loro vitalità, i loro sistemi enzimatici sono relativamente resistenti e possono rimanere attivi fino alla temperatura di -30°C . Questo è, in particolare, il caso delle lipasi e delle lipossidasi, che possono agire anche in presenza di un A_w limitato.

Le carni congelate non dovrebbero contenere un numero elevato di germi che possono svilupparsi se lo scongelamento ed il ricongelamento avvengono in condizioni non controllate. E' anche importante conservare le carni congelate (soprattutto se grasse) a -20°C , se devono essere conservate per lunghi periodi.

La degradazione della carne avviene durante lo scongelamento e la sua entità e caratteristiche sono influenzate decisamente dalle modalità dello scongelamento prima indicate. Le alterazioni biochimiche della degradazione dipendono dalle condizioni ambientali e dal tipo di flora che si sviluppa.

Se la degradazione è causata dalle muffe, si sviluppa un particolare odore di terriccio e avvengono processi lipolitici.

E' difficile distinguere se la rancidità è causata dai bat

teri o dagli enzimi tissutali o è di natura ossidativa.

Quando il congelamento, la conservazione e lo scongelamento sono stati eseguiti correttamente la degradazione segue il suo corso normale: di tipo ammoniacale in condizioni aerobiche; di tipo acido in condizioni anaerobiche.

I germi patogeni della carne congelata sono gli stessi della carne fresca prima del congelamento, ma il loro numero può essere molto cambiato. E' un errore credere che il congelamento possa uccidere i germi patogeni presenti nella carne.

In primo luogo non tutti i germi vengono uccisi, secondo, il congelamento è solo parte della storia dell'alimento.

Per esempio le cellule vegetative del Cl. perfringens diminuiscono rapidamente di numero nella carne congelata, ma le spore rimangono inalterate e la moltiplicazione può essere rapida durante lo scongelamento ad elevate temperature.

Nella carne congelata è pure stata riscontrata la presenza di salmonelle.

In tutti i casi si sviluppa un processo alterativo in circostanze sfavorevoli allo sviluppo dei germi patogeni aerobi e non si creano problemi di significato igienico.

Quando lo scongelamento è effettuato a temperature troppo

elevate può esserci il rischio di contaminazione da clostridi.

Carni cotte

Alcuni tipi di preparazioni carnee cotte contengono ancora una flora batterica residua. Il colore cambia dal rosso al grigio, alla temperatura di 60°C, ma le temperature di cottura delle bistecche al sangue o dei roast beef o di preparazioni simili possono variare tra 40°C/60°C con conseguente possibile rischio per i consumatori:

Il trattamento col calore varia a seconda del periodo di conservazione che si vuole attribuire al prodotto.

- a) Alcuni tipi di preparazioni carnee sono pastorizzate a 60°C/75°C e tali temperature inattivano i batteri, i lieviti e le muffe, i parassiti e la maggior parte dei virus:
- b) certe carni inscatolate sono riscaldate più severamente con temperature centrali dei prodotti che raggiungono i 115°C/120°C in modo da inattivare le spore di Cl. botulinum;
- c) infine altri prodotti alimentari inscatolati sono scaldati a temperature più elevate o per tempi più prolungati per distruggere le spore dei bacilli termofili.

La carne cruda usata per la produzione di queste preparazioni commerciali possiede la flora comune a tutti i tipi di carne. Dopo la pastorizzazione, possono essere presenti bacilli, streptococchi fecali e microbatteri.

I germi patogeni sono di solito assenti in queste preparazioni tranne se si verificano delle contaminazioni post-trattamento termico.

Le tipiche preparazioni industriali prodotte con questo tipo di carne sono prodotti tipo patè, galantine, terrine ecc.

Alcune di queste devono essere riscaldate prima di essere consumate, altre lo possono essere senza alcun trattamento a caldo.

A meno che esse non siano immediatamente commercializzate e consumate, queste preparazioni dovrebbero venire mantenute alle temperature di refrigerazione in modo tale che le spore dei bacilli mesofili e dei clostridi non possano germinare e moltiplicarsi.

I microrganismi Gram negativi sono maggiormente sensibili al trattamento termico, seguiti dai bastoncini asporigeni Gram positivi; gli streptococchi fecali ed i bacilli sono più resistenti al calore.

Nei prodotti pastorizzati dopo confezionamento (patè), la

degradazione dipende dalla flora sopravvivente e dalle condizioni di conservazione, specialmente dalla temperatura.

Di solito i germi sopravvivalenti che possono crescere e degradare il prodotto sono ceppi psicrotrofi di micrococchi, di streptococchi, di lattobacilli e occasionalmente di Microbacterium.

I prodotti carnei cotti sono terreni eccellenti per la crescita di batteri, lieviti e muffe e per questi prodotti la possibilità di ricontaminazione è un aspetto particolarmente importante.

Durante la manipolazione dopo la cottura, la superficie di questi prodotti può venire contaminata da bastoncini mesofili Gram negativi (Enterobacteriaceae), da cocchi Gram positivi e da bastoncini Gram positivi o da loro combinazioni.

La contaminazione da batteri deriva dalle mani e dalle superfici a contatto con la carne cotta e da muffe trasmesse per via aerea.

Il confezionamento sottovuoto prolunga la vita commerciale di questi prodotti perchè impedisce lo sviluppo della microflora aerobia.

Nelle confezioni sottovuoto predominano i germi lattici.

Nelle preparazioni gastronomiche miste, la contaminazione

batterica dipende in minor grado da quella della carne, ma i germi contaminanti provengono da altri ingredienti.

Quando le carni cotte sono tagliate a fette ed imballate dopo il trattamento termico, la microflora delle fette deriva dalle macchine affettatrici e dagli utensili. Se queste operazioni^{sono} effettuate a 10°C, la flora batterica può essere psicrotrofa e anche se il prodotto affettato è mantenuto a temperature di frigorifero può avvenire un rapido accrescimento batterico.

La vita commerciale dei prodotti carnei trattati termicamente varia a seconda della severità del trattamento termico, e delle possibilità di ricontaminazione.

Le fette di carne cotta o altri tipi di prodotti carnei manipolati dopo la cottura hanno una vita commerciale inferiore ad una settimana anche se mantenuti a temperature inferiori ai 5°C.

La degradazione di questi tipi di prodotti di solito è di tipo non proteolico. Di solito si sviluppa un odore ed un gusto di acido.

Se si verifica una ricontaminazione da germi proteolitici possono avvenire processi proteolitici e l'odore diviene ripugnante.

Se il prodotto carneo è conservato a temperature superiori

a 20°C le spore, specialmente quelle dei clostridi, possono germinare e moltiplicarsi, per cui la degradazione può essere di tipo putrido con sviluppo di grassi. D'altra parte perchè un alimento si renda responsabile di tossinfezione da Cl. perfringens deve essere accettabile organoletticamente.

Il Cl. perfringens è il patogeno più frequentemente presente negli alimenti pastorizzati. L'avvelenamento causato da questo microrganismo richiede la presenza nell'alimento di almeno 10^9 cellule per grammo, e ciò si può verificare solo quando questi alimenti sono conservati per alcune ore alla temperatura di 35/40°C.

In questi alimenti già cotti la crescita del clostridio è favorita dall'assenza di germi competitivi che sono stati distrutti dalla cottura precedente la preparazione dell'alimento.

Gli avvelenamenti da Cl. perfringens vengono frequentemente causati da cibi preparati nelle cucine per collettività a causa delle difficoltà di operare una corretta preparazione dei pasti.

Lo Staph. aureus dovrebbe essere ucciso normalmente dal trattamento calorico dato a questi prodotti, ma le tossine preformate, se presenti, potrebbero rimanere nella carne

e causare avvelenamento alimentare.

Più spesso, tuttavia, gli stafilococchi sono introdotti do po la cottura, dopo l'affettamento degli alimenti o dopo altre manipolazioni e provengono dai lavoranti.

Anche le salmonelle dovrebbero essere distrutte durante la cottura e i casi di salmonellosi dovuti all'ingestione di carni pastorizzate sono causati da contaminazione crociate dopo la cottura.

Questo accade nei laboratori dove le carni fresche contami nate da salmonelle vengono direttamente a contatto con la carne cotta; il personale stesso può trasmettere la conta minazione manipolando i due tipi di carne; anche gli uten sili contaminati possono trasmettere le salmonelle.

In conclusione, la cottura eliminando la flora competitiva facilita la moltiplicazione dei germi patogeni ricontami- nanti e questi microrganismi crescendo, non modificano con la loro attività metabolica le caratteristiche organoletti che dell'alimento che viene consumato e provoca malattia.

Un appropriato congelamento o una adeguata refrigerazione prevengono lo sviluppo di patogeni.

Prodotti carnei trattati con calore ma non addizionati di nitrito

Le carni non salnitrate e i prodotti sottoposti a trattamenti termici per conservarli per lunghi periodi a temperatura ambiente devono essere trattate termicamente per distruggere le spore botuliniche o altre spore batteriche con maggiore resistenza termica.

Queste carni e questi prodotti devono venire protetti dalle contaminazioni susseguenti i trattamenti termici con involucri metallici, plastici o di vetro.

La carne e i prodotti carnei sono normalmente trattati col calore, ma sta diffondendosi il sistema del confezionamento asettico.

La maggior parte dei prodotti inscatolati rientra nella categoria ad elevata acidità, ma sono pochi e si tratta delle carni marinate.

I prodotti carnei di cui stiamo parlando richiedono almeno 12 D di trattamento termico.

Le carni preparate igienicamente, normalmente, contengono meno di una spora di clostridio/g e meno di 10 bacilli/g . Gli spolpi di testa, i diaframmi, le pelli di suino, che di solito sono usati in prodotti di bassa qualità, frequentemente contengono più elevate quantità di spore.

La fonte principale di spore è costituita normalmente dagli ingredienti non carnei usati nella preparazione dei prodotti finali. Molte spezie contengono fino a 10^6 g/g e si raccomanda l'uso di spezie decontaminate o di estratti di spezie per la produzione di alimenti carnei inscatolati.

Altre fonti di spore sono gli involucri per salsicce, i vegetali e, anche, talvolta, i contenitori, soprattutto quelli di cartone.

I prodotti inscatolati, non trattati col nitrito, possono essere alterati per 3 cause differenti:

a) Crescita di batteri prima del riscaldamento termico

Se un impasto carneo è mantenuto ad una temperatura relativamente elevata prima di essere confezionato in contenitori metallici o di vetro, le cellule vegetative possono moltiplicarsi e causare il deterioramento dell'impasto, ma il trattamento termico può essere così drastico da rendere sterile il contenuto della scatola. L'esame microscopico del contenuto è utile per rilevare il corpo dei microrganismi morti.

Se i microrganismi che si sviluppano tra la chiusura del contenitore e il trattamento termico formano gas, le scatole possono trovarsi gonfiate, ma prive di germi.

b) Sopravvivenza di spore resistenti al calore

Alcune spore di mesofili hanno una resistenza termica più elevata di quella del Cl. botulinum, per esempio, alcuni ceppi di Cl. sporogenes e di altri anaerobi putrefacenti per i quali è necessario un valore di $D_{121.1}$ di 1 minuto. Un processo termico predisposto per uccidere 10^{12} spore botuliniche ($F = 2,5$) non dovrebbe distruggere 10^3 o più spore con tale resistenza termica.

Molte carni non salnitrate, inscatolate, sono riscaldate in pratica sino ad attivare un elevato numero (10^6 o più) spore di Cl. sporogenes, che richiederebbero, invece, un valore F di 4-6.

Dopo un inadeguato trattamento termico, le spore sopravvivenenti potrebbero germinare e crescere nelle scatole, specialmente dopo una prolungata conservazione a temperatura ambiente o dopo una temperatura di incubazione tra i 30 e i 40°C. Il Cl. sporogenes, un microrganismo proteolitico, produttore di gas, può causare bombaggi.

c) Fessurazioni post trattamento termico

Le carni in scatola possono essere alterate da germi che penetrano nella scatola attraverso fessure.

Quando, dopo il trattamento termico, la scatola calda viene raffreddata, può penetrare dell'acqua contaminata attra

verso le fessurazioni dei suggelli. Per evitare tale tipo di contaminazione si deve clorare l'acqua.

Il Cl. botulinum è il microrganismo più pericoloso nei prodotti a bassa acidità e, quindi, tutti i processi termici di riscaldamento sono basati sulla sua termoresistenza, ma molti altri sono ancora più intensi assicurando la distruzione anche dei germi più termoresistenti.

Le carni in scatola industriali sono state raramente coinvolte in episodi di botulismo. I patè di fegato hanno causato casi di botulismo A e B quando sono stati preparati senza rispettare i corretti piani di riscaldamento.

Le spore degli altri patogeni, come il Cl. perfringens e il B. cereus, hanno una resistenza termica considerevolmente inferiore a quella del botulino per cui i procedimenti termici applicati per la distruzione di questo germe sono sufficienti per distruggerli.

La presenza di salmonelle e di Staph. aureus è conseguente a contaminazioni dopo il trattamento termico.

Carni trattate col nitrito e col calore

I prodotti carnei riscaldati e trattati col nitrito possono venire suddivisi in 3 gruppi: a) pastorizzati; b) sterilizzati e biologicamente stabili; c) sterilizzati.

a) Prodotti carnei pastorizzati

I prodotti pastorizzati e trattati col nitrito si possono dividere in due classi: quelli che sono confezionati, riscaldati e venduti integri e quelli che dopo aver subito tale trattamento sono venduti sezionati. Entrambi vanno conservati alla temperatura di refrigerazione.

Effetti della lavorazione sui microrganismi

L'attività dell'acqua della maggior parte di questi prodotti è elevata ad eccezione di alcuni come la mortadella.

Il livello di sale per i vari prodotti è compreso tra 1,2 e 4,5%. La quantità di nitrito presente varia da "tracce" a 150 ppm. Il pH finale è superiore a 6 e il trattamento termico impartito è compreso tra 70°C e 85°C ambientali con una temperatura a cuore di 65°C - 75°C.

I prodotti che vengono sconfezionati o riconfezionati possono essere contaminati da lattobacilli, Leuconostoc e da Gram negativi psicrotrofi oltrechè da enterobatteri.

La microflora dei prodotti confezionati comprende spore di bacilli e di clostridi che spesso derivano dalle spezie utilizzate. Possono sopravvivere alcuni ceppi di lattici e di streptococchi.

I lattobacilli e gli streptococchi fecali si moltiplicano durante la conservazione allo stato refrigerato e possono

alterare questi prodotti dando luogo ad acidificazione e a decolorazioni.

Gli imballaggi in film impermeabili all'aria, creano un ecosistema che impedisce la crescita degli aerobi obbligati e dei germi sensibili alla CO₂. La flora che si sviluppa è invece favorita dalla presenza di CO₂ ed è costituita appunto da lattici, da leuconostoc e, talvolta, da B. thermosphacta.

La vita commerciale dei prodotti carnei pastorizzati, con Aw, elevata è di poco superiore a quella della carne fresca. I lattici e i leuconostoc danno luogo a mucopolisaccaridi e a perossidi, che ossidano la nitrosomioglobina in porfirina ossidata di colore verde.

Se, nei prodotti pastorizzati, mancano gli zuccheri, essi diventano putridi. Il germe patogeno più sovente rintracciabile nei prodotti pastorizzati è lo Staph. aureus.

Esso non sopravvive ai trattamenti termici ma, frequentemente proviene dalle mani delle persone addette alla preparazione delle carni.

Altri germi patogeni sono raramente presenti.

Per questi prodotti è necessaria la conservazione in frigorifero e l'osservanza dei tempi di scadenza.

b) Carni in scatola sterilizzate, biologicamente stabili

La stabilità di questi prodotti è basata sulla combinazione del trattamento termico e le concentrazioni di sale e di nitrito.

Sono alimenti di solito riscaldati a 100°-115°C, per non comprometterne le caratteristiche organolettiche. Espresi come valori di F, questi trattamenti termici corrispondono a F = 0,4-0,6, ma si possono usare anche valori di 0,05.

Chiaramente i valori F sono insufficienti a non garantire la degradazione e a impedire la crescita di Cl. botulinum, ma la loro conservabilità e salubrità si ottengono dalla azione del nitrito che, durante il processo termico, consente di uccidere la maggior parte delle spore presenti e impedisce la loro germinazione.

Gli aspetti microbiologici della produzione di questi prodotti non sono molto differenti da quelli dei prodotti trattati precedentemente.

Le cause delle alterazioni sono: a) un'elevata quantità di anaerobi mesofili; b) un inadeguato trattamento termico; c) una bassa concentrazione degli agenti di salagione; d) una combinazione di questi fattori.

In alcuni casi la degradazione è sostenuta da clostridi e si rivela con la produzione di gas fetido. In altri casi

è dovuta allo sviluppo di bacilli con gas inodore (N_2, CO_2)

Il bombaggio dei bacilli è meno evidente.

Il patogeno eventualmente presente è il Cl. botulinum, ma costituisce un rischio solo teorico perchè in realtà l'azione combinata del sale, del nitrito e l'Aw dell'impasto rendono impossibile il suo sviluppo.

c) Prodotti sterili

I prodotti assolutamente sterili sono di 3 tipi: a) quelli che hanno dei livelli di sale e di nitrito così bassi da esercitare un effetto minimo sui batteri; b) quelli che sono trattati col sale ma non col nitrito; c) quelli destinati alle zone tropicali.

Le prime due categorie sono delle conserve sterili e sono sottoposte a trattamenti termici di F_0 3-5,5.

Le conserve tropicali sono riscaldate a F_0 di 12-15.

POLLAME E PRODOTTI DERIVATI

Per carne di pollo s'intende il tessuto muscolare con pelle e tessuto connettivo.

Per frattaglie intendiamo gli organi edibili.

Oltre al pollame si utilizzano come cibo anche altri volatili: tacchini, oche, anatre, quaglie, colombe.

Caratteristiche

Il contenuto d'acqua è di circa il 66-71% per i polli, il 56% per le galline e i tacchini grassi.

Il contenuto di proteine e di grassi, mediamente, sono di circa il 20% e il 2,7% per i polli, il 20,2% e il 12,6% per i tacchini, il 20,1% e il 18% per le anatre.

Diversamente dalla carne rossa, nella quale il grasso è distribuito entro il tessuto muscolare, la maggior parte del grasso nel pollame è localizzato sotto la pelle e nella cavità addominale.

La quantità di grasso varia con l'età, il sesso, il taglio anatomico, la specie.

Oltre ai componenti, altre proprietà influenzano lo sviluppo dei germi. L'Aw è di circa 0,98-0,99-1,00, a seconda delle condizioni di conservazione delle carni. Il pH del petto è di 5,7-5,9, mentre quello della coscia è di 6,4-6,7. Il potenziale redox è simile a quello della carne dei mammiferi.

La pelle, che contiene un elevato numero di germi, rappresenta una barriera alla loro penetrazione nel tessuto muscolare sottostante.

A causa della loro composizione e delle altre proprietà, la carne di pollo e la pelle sono un eccellente substrato per una vasta varietà di germi.

Produzione

Le uova fertilizzate sono raccolte, fumigate e incubate a temperatura costante per 21 gg per i polli e per 20 gg per i tacchini.

Dopo la schiusa, i pulcini e i tacchinotti sono raccolti in capannoni ove vengono allevati per 6-15 settimane fino ad essere avviati al macello.

Qui giunti, sono appesi alla catena aerea, vengono storditi elettricamente ed uccisi tramite la recisione della carotide.

Si rimuovono le penne, le piume, i visceri; le carcasse sono lavate, refrigerate e trasportate per la vendita con ghiaccio, o refrigerate o congelate.

Una certa proporzione è lavorata (vedi schema allegato).

Flora microbica iniziale

La contaminazione microbica delle uova può avvenire nello ovario o negli ovidotti; raramente durante la formazione dell'uovo, o più tardi in seguito alla penetrazione attraverso il guscio.

Infezione e contaminazione delle uova

Alcuni microrganismi - salmonelle, E. coli e micoplasmi, vibrioni ed enterococchi, possono infettare l'ovario e gli ovidotti delle galline.

I microrganismi si trasmettono dall'ovario all'uovo e dall'ovidotto al tuorlo, all'albume durante la formazione dell'uovo.

I gusci dell'uovo sono contaminati da microrganismi che sono presenti nell'intestino, quando l'uovo passa attraverso la cloaca o quando essi giungono a contatto con la lettiera.

I batteri Gram-negativi che penetrano nell'uovo tramite l'ovario o per penetrazione attraverso il guscio, possono raggiungere il tuorlo e poi contaminare l'embrione. La contaminazione del guscio può venire ridotta o annullata migliorando le condizioni igieniche di produzione.

I gusci d'uovo contaminati, il materiale fecale, le lettiere, contaminano gli incubatoi e le correnti d'aria possono distribuire i microrganismi in tutti gli allevamenti.

I polli neonati vengono colonizzati dalla ingestione di feci, da polveri, aerosols e dal contatto con superfici esterne. Un pollo sano, così come qualsiasi altro animale, è portatore di milioni di microrganismi nel suo intestino e sulla sua pelle. Quella presente è la sua flora tipica e si oppone allo sviluppo dei germi patogeni.

Tuttavia questi possono essere presenti.

Sulle penne e sulle piume si trovano germi psicrotrofi.

Gli alimenti per il pollame possono essere più o meno contaminati con microrganismi saprofiti o patogeni e così la acqua da bere.

Pseudomonas, Chromobacterium, Acinetobacter, Moraxella, Aeromonas, Alcaligenes, Yersinia, Micrococcus e Bacillus sono la flora naturale dell'acqua di superficie.

Enterococchi e enterobatteri sono contaminanti comuni.

Il loro tempo di sopravvivenza varia con la specie, il ceppo e con la temperatura, l'intensità e la durata della luce solare, il pH, la quantità d'ossigeno disciolta e la concentrazione di sostanza organica.

Sebbene l'acqua alla sorgente sia pochissimo contaminata, essa lo diviene durante la sua distribuzione.

L'acqua che bagna le lettiere favorisce le moltiplicazioni di coccidi, funghi e batteri e favorisce lo sviluppo di vermi parassiti.

Il suolo è un serbatoio di molti generi di batteri, di lieviti e di muffe. Le spore batteriche possono sopravvivere nel terreno per anni.

Alcune cellule vegetative per settimane o per mesi. La natura del suolo, l'intensità e la durata della luce solare, il pH, la percentuale d'umidità, il livello e la varietà della popolazione batterica influenzano la sopravviven-

za dei microrganismi.

Le lettiere sono esse stesse contaminate e lo divengono ancora di più con l'emissione di feci e con il contatto con l'ambiente esterno.

Più rimangono in luogo e più si creano condizioni sfavorevoli per lo sviluppo di batteri a causa dell'aumento del pH e dell' NH_3 .

Tuttavia le vecchie lettiere diventano un buon terreno di crescita per lieviti e muffe.

Il tipo e il numero di microrganismi trovati sulle penne e la pelle degli uccelli vivi e, conseguentemente sulle carcasse toelettate, sono grandemente influenzati dal tipo e dalle condizioni della lettiera sulla quale il pollame è stato allevato.

Alcune operazioni producono, in questi ambienti, molta polvere con conseguente possibilità di trasmissione di microrganismi, soprattutto se è concomitante una elevata umidità ambientale.

Altri vettori e serbatoi

Alcuni insetti sono ospiti intermedi di parassiti del sangue e dell'intestino.

I roditori e gli altri piccoli mammiferi possono distribuire germi al pollame. Certi uccelli selvatici frequente-

mente giungono a contatto con i volatili domestici e possono distribuire germi patogeni tra i vari allevamenti e così pure i rettili.

Anche i lavoranti possono disseminare agenti infettivi con le scarpe e il vestiario.

Trasmissione

I volatili infettati con germi patogeni diffondono i germi reaponsabili ai lavoranti e ad altre carcasse durante la lavorazione.

Molti microrganismi, incluse le specie patogene, si trovano nelle feci.

I lattobacilli, i bifidobatteri, i batteri anaerobi e gli streotococchi fecali costituiscono il nucleo centrale della flora fecale.

I germi fecali possono aderire alle penne, alle zampe e venire inalati tramite le vie respiratorie.

Alcuni germi patogeni, presenti nelle secrezioni nasali, sono Chlamidya psittaci, Haemophilus, Francisella e Staph. aureus. Quest'ultimo è presente comunemente sulla pelle e nelle lesioni tessutali. Il pollame può venire contaminato dall'acqua da bere, dai cibi, dal suolo contaminato da uccelli infetti.

I giovani pulcini sono dei potenti eliminatori di salmonel

le e sono molto sensibili al numero di germi patogeni con cui vengono a contatto, mentre gli adulti sono più resistenti.

Il cannibalismo di un pollo infettato favorisce la distribuzione di molti microrganismi patogeni o soprofiti che sono naturalmente presenti nell'intestino o sulla pelle.

Calore eccessivo, freddo, o altri fattori stressanti abbassano il potere di difesa alle infezioni e contribuiscono a diffondere la contaminazione.

Tutte queste condizioni sono note ai tecnici che cercano di minimizzarle mediante opportuni provvedimenti tecnici.

Carcasse refrigerate e prodotti derivati.

In generale la macellazione del pollame si svolge attraverso le fasi seguenti: rimozione delle gabbie, appendimento alla catene aeree di lavorazione, stordimento, uccisione mediante recisione delle arterie carotidiche e dissanguamento, scottatura, depennatura, spiumatura, eviscerazione e lavaggio. Il capo, le zampe, gli intestini, i polmoni sono tolti. I visceri edibili sono tolti e ispezionati. Le carcasse sono usualmente lavate con lo spray e refrigerate.

Dopo refrigerazione sono divise per peso e confezionate.

Questa operazione può essere effettuata prima della refri-

gerazione, a seconda del tipo di raffreddamento usato.

Talvolta i visceri edibili e il collo sono rimessi nella cavità addominale e la carcassa è confezionata e conservata in frigorifero.

Alcune operazioni promuovono un significativo aumento della contaminazione o permettono la moltiplicazione batterica e altre ottengono l'effetto contrario.

La macellazione di partite contaminate è la fonte principale dei microrganismi sulle carcasse dei polli.

Le samonelle, per esempio, sono trasmesse da carcassa a carcassa durante la lavorazione. Le piume, le penne, le zampe, gli intestini e la parte esterna del corpo sono contaminate con i batteri. Talvolta del materiale fecale viene espulso dalla cloaca in seguito allo stordimento elettrico e durante la spennatura automatica.

Utensili e attrezzature

I microrganismi sono trasferiti dalle superfici corporee contaminate agli utensili e alle attrezzature e da queste, a loro volta, alle carcasse. In pratica la trasmissione dei microrganismi e la ricontaminazione sono continue.

Sono quindi necessarie la pulizia e l'adozione di speciali norme igieniche di lavorazione nonché la disinfezione delle apparecchiature e degli utensili, evitando la persisten

za di residui organici che servono da sostanze nutritive per la moltiplicazione dei germi.

Acqua di lavorazione

L'acqua usata per il lavaggio dei polli deve essere potabile altrimenti potrebbe introdurre altri microrganismi nello stabilimento di mattazione. Pseudomonas ed Aeromonas, sono la flora predominante che si rinviene di solito nella rete di approvvigionamento e il loro sviluppo è notevole in corrispondenza dei rubinetti sporchi con materiale organico.

Ghiaccio

La flora batterica del ghiaccio ricavato da acqua non potabile è costituita da Acinobacter, Moraxella, Pseudomonas, Corynebacterium e da cocci.

Molti batteri psicrotrofi contaminanti le carcasse provengono dal ghiaccio.

Lavoranti

I microrganismi sono trasferiti dalle carcasse contaminate alle mani dei lavoranti e poi alla superficie di altre carcasse.

I lavoranti possono contrarre e trasmettere germi nella loro pelle, nei capelli, nelle cavità nasali e boccali, mentre lavorano, specialmente se hanno infezioni cutanee o

delle vie respiratorie o se lavorano con scarsa igiene.

I lavoranti corrono rischi personali giungendo a contatto con germi patogeni con le loro mani, nei tagli o in altre lesioni o inalandoli nel tratto respiratorio. Possono ammalarsi e ridistribuire i germi nell'ambiente di lavoro.

La contaminazione delle carcasse da parte dei lavoranti è tuttora di entità minore rispetto a quella che deriva dai volatili viventi.

Aerosol e polveri

Aerosol e polveri si producono principalmente durante l'uccisione la spennatura ed il lavaggio mediante spruzzo.

L'area dei locali in cui vengono condotte queste operazioni è più contaminata di quella di altre zone.

Vettori

Insetti, roditori o uccelli che accedono agli impianti di lavorazione contribuiscono pure alla contaminazione degli ambienti di lavoro soprattutto se vengono a contatto con i depositi dei rifiuti o con gli ambienti sporchi o con le carcasse.

Tuttavia la contaminazione da vettori è indubbiamente minore se comparata a quella provocata da volatili introdotti per la macellazione.

Sbollentatura

Le carcasse vengono scottate per facilitare la rimozione delle penne. I metodi consistono nell'immersione diretta, nello spray con acqua calda, nell'aspersione di calore e spennatura.

L'immersione in acqua calda è il metodo più usato e consiste nell'immersione del volatile per 2-3' in acqua a 60-63°C. L'acqua del tank è continuamente sostituita alla velocità di 0,2-1 litri per carcassa e per minuto.

Terriccio, polvere, materiale fecale dalle zampe, dalle penne, dalla pelle, dal tratto intestinale e da quello respiratorio sono continuamente liberate nella vasca di scottatura.

La continua immissione di acqua calda e la sua sostituzione, rimuovono molti contaminanti e il calore dell'acqua ne uccide altri.

Dopo un aumento iniziale dei batteri, il loro numero per ml di acqua rimane relativamente costante.

I batteri attaccati alla pelle sono più resistenti al calore di quelli che non lo sono.

Spennatura

La conta totale aumenta significativamente dopo la spennatura come conseguenza della diffusione dei microrganismi ad opera della spennatrice e per la inadeguata pulizia del

le raspe di gomma di cui sono dotate.

Così la spennatura può diffondere microrganismi da poche carcasse contaminate a molte altre.

Eviscerazione

Durante l'eviscerazione i microrganismi possono venire trasferiti da carcassa a carcassa dai lavoranti e dagli utensili.

L'apertura manuale della cavità addominale e l'eviscerazione manuale contribuiscono a far aumentare considerevolmente la contaminazione crociata, specialmente se l'intestino è stato leso.

L'asportazione dei visceri mediante aspirazione meccanica rimuove qualche contaminazione fecale. Questa operazione effettuata in modo igienico non peggiora la situazione.

Lavaggio spray

Il lavaggio spray delle carcasse dopo la spennatura e la eviscerazione rimuovono il materiale organico e i microrganismi superficiali che si sono aggiunti durante l'eviscerazione.

La clorazione dell'acqua con 40-60 ppm, causa un'addizionale riduzione della conta totale.

Raffreddamento

Il raffreddamento rallenta lo sviluppo degli psicrotrofi,

prolunga così la vita commerciale e previene lo sviluppo della maggior parte dei patogeni. Le carcasse vengono refrigerate mediante immersione in vasconi contenenti ghiaccio o acqua fredda, oppure lo sono mediante getti di acqua fredda, o mediante circolazione di aria fredda o di altri gas.

a) Vasca di refrigerazione statica - Il raffreddamento mediante l'immersione delle carcasse in una eguale quantità di acqua, ghiaccio utilizza il vantaggio della forte capacità refrigerante del ghiaccio.

Se le carcasse sono tenute da 4 a 24 h in questo bagno i germi psicrotrofi possono moltiplicarsi sulla carcassa e nell'acqua.

La clorazione con 5-20 ppm può venire usata per limitare lo sviluppo batterico. Questo metodo è stato istituito per i polli, ma è ancora usato per i tacchini.

b) Raffreddamento mediante immersione continua - le carcasse sono immerse in acqua fredda e rimosse con una vite senza fine attraverso una o più vasche. Il corso dell'acqua può avvenire secondo o contro la direzione delle carcasse. Acqua prerrefrigerata o del ghiaccio sono posti nell'ultima parte della vasca o nell'ultima vasca, se si usano più vasche in serie.

L'immersione continua in acqua refrigerata presenta un vantaggio netto sul sistema statico, perchè porta le carcasse di pollo refrigerate ad una temperatura equilibrata di 4°C in meno di 1 h.

L'agitazione meccanica rimuove alcuni dei microrganismi dalla carcassa.

L'uso dell'acqua controcorrente diminuisce effettivamente il numero totale dei germi sulle carcasse e minimizza la contaminazione crociata.

Questo metodo presenta però il grave inconveniente di arricchire d'acqua la carcassa aumentando l'umidità e quindi l'Aw.

c) Raffreddamento ad aria - Il raffreddamento ad aria fredda asciuga la pelle e così ritarda la crescita batterica. Quando si usa aria refrigerata i polli vengono immersi nelle vasche di spennatura con l'acqua a 50°C per evitare alterazioni della pelle o del colore.

Questo sistema ovviamente non riduce la carica batterica superficiale, ma solo rallenta lo sviluppo diminuendo l'Aw della pelle.

d) Raffreddamento con ghiaccio di CO₂ - Questo sistema ritarda la crescita microbica perchè rallenta o inibisce la moltiplicazione batterica, ma è costoso.

Pesatura e confezionamento

Le conte microbiche possono aumentare dopo la refrigerazione a causa del trasferimento di germi durante la pesatura ed il confezionamento e possono aversi contaminazioni crociate.

Le carcasse talvolta non sono eviscerate, sono rimossi solo gli intestini e possono esservi lasciate le penne.

La refrigerazione avviene a secco. La superficie della pelle è troppo secca per permettere un rapido sviluppo batterico.

Visceri edibili

Durante l'eviscerazione, i visceri edibili (cuori, fegati e durrelli) sono rimossi dalle carcasse, avviate alla loro preparazione in zone apposite e confezionate; oppure vengono reinseriti nella cavità addominale.

Nel primo caso sono immersi in contenitori ed avvolti da film estensibili.

Le attrezzature e gli utensili usati per la preparazione di queste parti possono essere contaminati e questi prodotti in genere lo sono più o meno massicciamente.

Sezionamento

I microrganismi dalle carcasse eviscerate sono trasmessi alle altre parti sezionate durante questa operazione.

In questo settore per evitare l'aumento della contaminazione si devono adottare particolari norme igieniche.

Alterazioni

La degradazione di carne di pollo refrigerata si manifesta con odori anormali seguiti da formazione di vischiosità, aumento del pH, dell'azoto basico volatile. Tali cambiamenti divengono avvertibili quando i germi raggiungono 10^8 /g.

1) Carcasse eviscerate - I fattori che influenzano la crescita batterica sulle carcasse eviscerate sono: a) il numero ed il tipo di psicrotrofi presenti dopo la lavorazione; b) la temperatura ed il tempo di conservazione; c) il tipo di tessuto (pelle o carne); d) il pH; e) il potenziale redox; f) il tipo di imballaggio; g) la presenza o l'assenza di CO_2 .

I batteri psicrotrofi entrano nell'impianto di macellazione tramite le penne e le zampe e in minor numero tramite l'acqua e il ghiaccio. Essi si moltiplicano sulle superfici sporche delle attrezzature e degli utensili, nelle acque di refrigerazione e sulla superficie dei volatili.

Acinetobacter, Flavobacterium e Cytophaga sono i generi più comunemente presenti sulla superficie dei polli uc-

cisi da poco. Ma la causa principale della degradazione della carne di pollo è rappresentata dallo sviluppo di Pseudomonas ed in minor grado da Alteromonas putrefaciens.

Pseudomonas spp sono la causa principale dell'alterazione delle carcasse avvolte in films permeabili; Microbacterium thermosphactum ed i lattobacilli atipici sono le cause principali di degradazione delle carcasse confezionate in films impermeabili. Il ridotto potenziale redox e l'accumulo di CO₂ intorno alle carcasse confezionate in films impermeabili inibisce la crescita degli Pseudomonas. Anche le Enterobacter spp possono degradare le carni di pollo confezionate sottovuoto.

2) Polli non eviscerati - I generi di microrganismi che si moltiplicano nei polli non eviscerati dipendono dalla temperatura. I batteri mesofili nell'intestino producono idrogeno solforato, che diffonde nel tessuto muscolare e che in presenza di aria, sotto la pelle, complessa i pigmenti emici del sangue dando luogo ad una decolorazione verde.

I microrganismi deterioranti psicrotrofi sulla pelle, sono incapaci di moltiplicarsi se la pelle secca ed intatta. Ma appena sono sezionati per rimuovere il ca-

po, il collo ed i visceri, i microrganismi deterioranti vengono trasmessi alle superfici muscolari e possono quindi moltiplicarsi e produrre odori sgradevoli.

3) Visceri edibili

I visceri si conservano meno del tessuto muscolare ad eccezione dei durrelli. La contaminazione accorcia la vita commerciale.

Non sono mai state riscontrate differenze di conservazione tra polli confezionati con o senza frattaglie.

Patogeni

Il pollame poco cotto o conservato male può diventare veicolo di malattie alimentari.

I germi patogeni più frequenti sono Salmonelle, Cl. perfringens e Staph. aureus. Altri, come la Yersinia e il Campylobacter, sono stati isolati da prodotti a base di pollo ma il loro significato sulla salute dell'uomo è dubbio.

Volatili congelati e prodotti a base di carne di pollo

Mentre il pollame refrigerato ha una vita commerciale di 12 giorni, quello congelato non subisce alcun attacco batterico.

Il congelamento può avvenire mediante esposizione a correnti

ti di aria fredda nei tunnel o nelle camere fredde, mediante immersione in salamoia, o con l'esposizione a gas freddi, o mediante congelamento con piastra.

Il congelamento e la conservazione allo stato congelato riducono il numero di microrganismi e la loro vitalità lesionandoli.

Alla temperatura inferiore a -10°C , i germi lesionati muoiono durante la conservazione, ma se la temperatura aumenta, possono riprendere a moltiplicarsi.

I batteri che si riducono di numero durante il congelamento sono quelli presenti nel film d'acqua sito sulla superficie delle carcasse e non quelli attaccati alla pelle o che si trovano nei follicoli entro di essa. Comunque, sulla superficie del pollame rimangono abbastanza batteri e si possono moltiplicare alterando il prodotto quando il pollame è scongelato.

Alterazione

Il pollame congelato non presenta problemi di conservabilità quando è mantenuto allo stato congelato. Alcuni lieviti e alcune muffe, comunque, possono crescere sulle carcasse congelate a -7°C . I germi responsabili sono il Cladosporium herbarum, che produce macchie nere, il Thamnidium elegans e il Thamnidium chaetocladioides, che formano del-

le pelosità, lo Sporotrichum carnis che dà luogo a macchie bianche.

I prodotti conservati propriamente (-18°C o meno) possono venire degradati dall'attività microbica solo prima e dopo lo scongelamento.

Se i prodotti sono lasciati scongelare e rimangono alla temperatura di refrigerazione, il prodotto diviene organoletticamente inaccettabile dopo un certo periodo di tempo in seguito allo sviluppo di microrganismi psicrotrofi. La velocità di degradazione dei polli congelati è dello stesso ordine di grandezza di quella dei polli refrigerati ed è influenzata dagli stessi fattori.

Nel pollame congelato possono verificarsi danni di natura enzimatica o fisica quando è conservato per lungo tempo.

Patogeni

I polli congelati possono contenere germi patogeni come quelli refrigerati e presentano lo stesso problema delle contaminazioni crociate dopo lo scongelamento. L'acqua di scongelamento può contenere diversi germi patogeni.

Prodotti cotti

Con la carne di pollame e con il pollame stesso si possono produrre diversi alimenti preparati cuocendoli in varie

maniere.

Effetto delle lavorazioni sui germi

La maggior parte di microrganismi presenti nei prodotti a base di carne di pollo destinati alla cottura derivano dalla carcassa stessa.

Tuttavia le spezie usate possono contenere fino a 10^6 g/g specialmente sporigeni come bacilli e clostridi. Le cellule vegetative normalmente sono distrutte in seguito alla cottura mentre non lo sono le spore. Le operazioni di inscatolamento sono le stesse dei prodotti non acidi.

I tempi e le temperature usate dovrebbero distruggere tutte le forme vegetative e tutte le spore. Tutti gli altri trattamenti di cottura, lessatura, brasatura, frittura, barbecue, se ben eseguiti, distruggono tutti i microrganismi e le contaminazioni sono, di solito, successive. In ogni modo le condizioni di cottura devono essere sempre attentamente controllate.

Alterazione

I prodotti cotti a base di carne di pollo dovrebbero avere bassissime o nulle cariche batteriche. La vita commerciale è strettamente correlata col tipo di trattamento usato e con le condizioni di conservazione.

Patogeni

I germi patogeni eventualmente presenti nei prodotti cotti possono essere delle salmonelle, degli stafilococchi e il Cl. perfringens.

In caso di presenza dei primi due microrganismi, è necessario accertare se si tratta di cottura insufficiente o di contaminazione susseguente alla cottura.

La cottura uccide tutte le forme vegetative, ma può risultare inefficace nei confronti delle spore di Cl. perfringens, che possono germinare a causa dell'abbassamento del potenziale redox conseguente alla cottura.

Se la temperatura di conservazione è troppo elevata e se quella di cottura è insufficiente, il Cl. perfringens può moltiplicarsi nel prodotto finito fino a concentrazioni pericolose per il consumatore.

Prodotti salati e trattati col nitrito

Le carni di volatile possono essere utilizzate per preparare prodotti di gastronomia od insaccati.

Le carcasse, o parte di esse, possono venire salate e preparate, dopo salagione, a secco o per via umida. Poi vengono sottoposte a cottura come si usa per i prodotti di carne suina.

Effetto delle lavorazioni sui germi

La salagione cambia selettivamente la flora batterica dei prodotti favorendo lo sviluppo dei micrococchi e dei funghi. Il calore, generato durante l'affumicamento, di solito, uccide i germi non sporigeni che sono presenti sulla superficie del pollame, ma dei trattamenti insufficienti possono permettere la sopravvivenza degli asporigeni. Le superfici dei prodotti essicano diminuendo la A_w . L'affumicamento deposita composti fenolici ed ac. acetico ed abbassa il pH superficiale.

Alterazione

I prodotti non pastorizzati, salati, salnittrati ed affumicati hanno una vita commerciale breve e possono essere alterati da muffe, se conservati in film permeabili ai gas. Conservati sottovuoto affumicati, a $+1^{\circ}\text{C}$ hanno una vita commerciale di circa 84 gg, quando sono pastorizzati a $70-80^{\circ}\text{C}$, di circa 104 gg quando sono pastorizzati a 99°C .

Patogeni

La salagione in salamoia contenente il 9-10% di cloruro di sodio inibisce la crescita di tutti i patogeni, se abbinata al freddo.

PRODOTTI DELLA PESCA

La composizione centesimale delle specie ittiche adoperate

come alimento per l'uomo è molto variabile. Soprattutto il contenuto in grasso varia considerevolmente a seconda della specie e della stagione. Il suo contenuto è inversamente proporzionale a quello in acqua.

I lipidi degli animali marini sono dei trigliceridi e dei fosfolipidi con acidi grassi a lunga catena insaturi.

Essi sono labili chimicamente e si ossidano facilmente durante la conservazione.

Il contenuto in carboidrati è trascurabile eccetto che nei molluschi, nei quali si può riscontrare anche il 3% di glicogeno.

I minerali del muscolo del pesce sono in scarsa quantità ma sono molto vari.

Nella tabella seguente riportiamo la composizione media della carne di pesce e di mollusco (Tab.II).

Il pesce contiene un'elevata quantità di composti azotati non proteici, la maggior parte dei quali sono piccole molecole disciolte nei liquidi muscolari e sono attivamente utilizzate dai microrganismi durante la degradazione del pesce.

Il muscolo del pesce è simile per struttura a quello dei mammiferi, ma le quantità di tessuto connettivo e quella del pigmento sono molto meno rispetto a quelle dei mammi-

feri.

Il tessuto muscolare costituisce un eccellente substrato per lo sviluppo dei microrganismi a causa della sua elevata Aw, del suo pH neutro e dell'elevato livello di nutrienti solubili.

La degradazione microbica del pesce è normalmente descritta come un processo proteolitico, ma è soprattutto l'azoto non proteico (il glicogeno nei molluschi) che viene utilizzato.

Pesce crudo

La carne e gli organi interni dei pesci appena catturati sono sterili ma l'intestino, le branchie e la pelle sono invece fortemente contaminati.

Il più importante fattore ambientale che influenza la composizione della microflora del pesce è indubbiamente la temperatura.

La popolazione batterica del pesce e dei molluschi è composta da psicrotrofi, tuttavia i batteri dei pesci tropicali e dei mari temperati sono mesofili.

Nella maggior parte dei casi la flora batterica è eurialina e non alofila.

Dal punto di vista nutrizionale e biochimico i batteri dei

pesci e dei molluschi utilizzano in massima parte i composti azotati piuttosto che i carboidrati, tuttavia certi batteri, come i vibrioni, sono in grado di utilizzare la chitina e gli zuccheri.

I microrganismi sono essenzialmente aerobi o anaerobi facoltativi e l'80% della popolazione è rappresentato da bastoncini Gram-negativi dei generi Pseudomonas, Alteromonas, Moraxella, Acinetobacter, Flavobacterium Cytophaga e Vibrio. Nelle acque calde prevalgono i corineformi e i bacilli. In aggiunta ai batteri possono essere presenti dei lieviti e, occasionalmente, delle muffe.

Vi sono dei generi di batteri che possono costituire un pericolo per la salute pubblica: il Cl. botulinum e il gruppo dei vibrioni.

Vi sono altri batteri potenzialmente patogeni che però sono dei contaminanti estranei e non possono venire considerati membri della normale popolazione batterica dei pesci e dei molluschi, sono: Cl. perfringens, l'Erysipelotrix rhusiopathiae, le salmonelle, le shigelle e le microalghe Goniaulax.

Per i prodotti della pesca dobbiamo anche ricordare il rischio potenziale dei virus nei molluschi.

Prodotti della pesca freschi

I pesci sono catturati con vari metodi basati essenzialmente sull'uso di ami e di reti. Dal tempo della cattura a quello della raccolta possono intercorrere molte ore cosicché le condizioni finali del pescato possono essere molto varie.

I pesci, dopo la cattura, devono essere protetti dalla degradazione durante il trasporto e dopo la lavorazione.

Tutte queste fasi si compiono da poche ore fino a 3 settimane o più. Di solito si usa il ghiaccio a -2°C oppure si ricorre al congelamento.

Il pesce può essere eviscerato a bordo prima della sua conservazione in ghiaccio. In altre parti viene portato a terra non eviscerato e per i pesci piccoli non si usa procedere a questa operazione.

Vi sono delle controversie circa l'opportunità o meno di compiere a bordo questa operazione. Il procedimento certamente rimuove una grande quantità di germi degradanti ed annulla la loro azione e quella degli enzimi intestinali, ma può far correre il rischio, se non viene bene effettuata, di distribuire i germi su tutte le superfici.

In genere i cambiamenti microbici che avvengono nel pesce conservato con ghiaccio sono gli stessi sia sulle navi che

a terra. Sulle navi, ovviamente, la conservazione del pe
sce è più difficile.

Mentre considerevoli quantità di pesce sono vendute evisce
rate o intere, altre vengono lavorate a mano o meccanicamente.

La contaminazione del pesce avviene generalmente dopo le
operazioni di cattura, durante la lavorazione e le fonti
di contaminazione derivano, come si è detto, dall'ambien
te, dai lavoranti e dalle parti contaminate del pesce stes
so.

Anche la qualità batteriologica dell'acqua è molto impor-
tante perchè, se clorata, può contribuire a ridurre la con
taminazione microbica.

Di solito i germi di origine umana e i mesofili non si mol
tiplicano perchè appunto il pesce è conservato allo stato
di refrigerazione e così, dopo 2 o 3 giorni di conservazio
ne, la flora microbica del pesce è costituita da Gram-, psi
crotrofi. Ovviamente il grado di contaminazione con que-
sto tipo di batteri, che sono responsabili della degrada-
zione dipende dalla qualità igienica delle lavorazioni e
dalla intensità della sanificazione, ma è anche funzione
del tipo di germi contaminanti.

Questi crescono quasi interamente sulla superficie del pe-

sce e la degradazione procede lentamente quando il rapporto tra superficie e volume è basso e rapidamente quando è alto.

Così la velocità di degradazione aumenta quando si passa dal pesce intero a quello eviscerato o affettato, a tranci o a quello triturato.

I cambiamenti qualitativi nelle popolazioni batteriche si accompagnano ai cambiamenti qualitativi della flora batterica. Di solito, i bastoncini Gram negativi divengono rapidamente predominanti a causa della loro capacità a svilupparsi a temperature inferiori a 5°C e perchè utilizzano i composti solubili azotati non proteici. Gli Pseudomonas, sono il gruppo batterico predominante nei pesci conservati col freddo.

La deaminazione ossidativa seguita dall'assimilazione di una certa parte dell' NH_3 prodotta serve come fonte di N_2 e costituisce il primo passo del processo. Ciò provoca un aumento di ammine volatili (principalmente NH_3 e acidi grassi liberi). Oltre a queste sono prodotte altre ammine in seguito alla scissione dei composti azotati non proteici tra cui la TMA che deriva dalla riduzione dell'ossido di TMA specialmente nei gadidi.

All'inizio del processo di deterioramento non vi è scissio

ne proteica che può invece verificarsi, sebbene ad un livello molto limitato, negli ultimi periodi quando i segni della degradazione diventano palesi. I composti contenenti zolfo come il metilmercaptano, il dimetilsolfuro e lo idrogeno solforato sono prodotti particolarmente da Alte-romonas putrefaciens. I composti responsabili dell'odore sgradevole sono i seguenti: metilmercaptano, etilmercaptano, dimetilsolfuro, idrogeno solforato, diacetile, acetaldeide, propionaldeide, etanolo, metanolo, acetone, acetoina, butanale, etanale, metilbutanale.

E' stato ricordato che gli Pseudomonas, Acinetobacter-Moraxella, sono i germi predominanti all'inizio della degradazione, ma sono presenti anche dei corineformi.

I batteri degradanti sono biochimicamente molto attivi, soprattutto nella riduzione dell'TMAO a TMA.

Si sono già ricordate le specie patogene eventualmente presenti nel pesce. Ricordiamo solo che, se sono presenti degli stafilococchi, la loro origine deve essere individuata nei lavoranti e che Shigelle e Salmonelle sono assai rari ed hanno la stessa origine.

I microrganismi che alterano il pesce sono psicrotrofi e, generalmente, crescono bene tra 0° e 30°C. I mesofili, che comprendono la maggior parte dei patogeni, crescono be

ne tra 5 e 40°C. Così i prodotti della pesca conservati a 5°C non permettono lo sviluppo dei patogeni.

Inoltre, nell'intervallo di temperatura entro il quale entrambi i gruppi di batteri crescono bene, gli psicrotrofi hanno una lag fase molto breve e quindi alterano il cibo prima che i patogeni possano raggiungere un livello pericoloso.

Per contenere i germi a un livello soddisfacentemente basso nel pesce, gli addetti dovrebbero mantenere buone condizioni igieniche a bordo, negli impianti di lavorazione e dovrebbero anche tenere il pesce a temperature inferiori a 3°C e soprattutto lavorarlo rapidamente.

Inoltre, il pesce va tenuto integro il più possibile prima della filettatura e non deve essere lesionato dagli strumenti di lavorazione..

Crostacei

Cattura e lavorazione

I crostacei sono catturati e trasportati vivi fino all'impianto di lavorazione. All'arrivo ciascun animale morto viene scartato. I gamberetti usualmente sono catturati con le reti e poi vengono addizionati di ghiaccio per il trasporto agli impianti di lavorazione. A differenza dei

crostacei di grosse dimensioni, i gamberetti muoiono rapidamente dopo la cattura. Sono quindi lavati e sgusciati automaticamente.

Saprofiti e degradazione

I microrganismi presenti sulla superficie dei grossi crostacei, durante il trasporto, sono quelli delle acque da cui essi provengono con l'aggiunta di quelli apportati dai pescatori e dalla superficie delle barche.

I microrganismi degradanti a questo punto hanno poca importanza perchè le carni dell'animale vivo sono sterili.

L'invasione batterica dei tessuti, che segue la loro morte, non ha alcuna importanza perchè le carcasse morte sono scartate.

La degradazione dei gamberetti è differente perchè gli animali muoiono rapidamente dopo la cattura. Inoltre le reti da pesci trascinano con se della fanghiglia insieme ai gamberetti. I batteri provenienti da questa fonte, dal ghiaccio e dai contenitori hanno l'opportunità di crescere durante il trasporto fino all'impianto di lavorazione: così la maggior parte dei gamberetti ha un'elevata carica batterica al momento della lavorazione. Vi sono parecchi lavori che segnalano la predominanza dei Gram negativi, ma sono anche presenti dei corineformi.

Durante la lavorazione, la carne dei crostacei subisce le stesse modificazioni biochimiche segnalate per il pesce: a queste vanno aggiunte le alterazioni di colore (melanosi) dovute a reazioni enzimatiche. A causa delle loro piccole dimensioni e dell'elevato rapporto superficie/volume, i gamberetti si alterano più rapidamente dei pesci.

I grossi crostacei subiscono le stesse variazioni biochimiche ma non ci sono lavori sui cambiamenti significativi dovuti ai microrganismi.

Quando sono raccolti in acque contaminate, i crostacei possono contenere dei patogeni, ma di solito vengono distrutti dalle lavorazioni.

Fa eccezione il Vibrio parahaemolyticus che può dar luogo ad intossicazioni perchè si può moltiplicare nelle carni di crostacei conservate a temperatura ambientale.

I crostacei e i gamberi delle acque temperate hanno una microflora dominata da Gram negativi e da corineformi. Durante la conservazione in ghiaccio, questi germi possono moltiplicarsi e soprattutto i Gram negativi.

Molluschi

I molluschi bivalvi sono raccolti di solito dai balani e le ostriche dai fondali delle zone di allevamento. Di so

lito sono trasportati vivi col guscio, generalmente senza refrigerazione. Sono venduti col guscio, raramente senza.~ Molto spesso sono consumati crudi.

I molluschi contengono dei microrganismi che vanno da 10^4 a 10^6 g/g. La microflora è costituita prevalentemente da bastoncini Gram negativi dei generi Vibrio, Pseudomonas, Acinetobacter-Moraxella, Alcalingenes, Flavobacterium e Citophaga.

Durante la degradazione Pseudomonas e Vibrio sono probabilmente i germi predominanti: oltre ad essi e in maggior numero possono svilupparsi i lattobacilli perchè i molluschi contengono glicogeno.

Dal punto di vista biochimico la degradazione comprende processi proteolitici e glucidolitici. Si accumulano NH_3 , delle ammine e acidi. Il pH di solito diminuisce. Durante la loro vita i molluschi filtrano i microrganismi presenti nell'acqua. La quantità filtrata da un ostrica può essere di 40 l/h; così la capacità di concentrare microrganismi è elevata.

Batteri enterici, e virus provenienti dagli esseri umani o dagli animali possono così concentrarsi e trasmettersi ai consumatori, se si cibano di molluschi crudi.

La lavorazione del pesce e dei molluschi d'acqua dolce è

simile a quella dei pesci di mare. Tuttavia per questo tipo di pesci, di solito, esistono meno problemi perchè il punto di consumo e il tempo del trasporto sono ridotti.

Prodotti della pesca congelati

Si sottopongono a surgelamento i pesci interi, o porzionati da soli o confezioni in blocchi. Il surgelamento è rapido ed avviene a bassissime temperature. La conservazione è a -18°C . Lo scongelamento migliore deve essere effettuato a $+3^{\circ}\text{C}$ o mediante immersione in acqua fredda.

Le conte batteriche dei prodotti congelati riflettono la qualità batteriologica del materiale grezzo e la contaminazione avvenuta durante le fasi della lavorazione.

La riduzione del numero di batteri in conseguenza del congelamento e della conservazione allo stato di congelamento è molto variabile e ciò rende difficile stabilire la qualità batteriologica del prodotto prima del suo congelamento.

I batteri psicrotrofi dei pesci non sono particolarmente resistenti allo stress da congelamento ma la risposta è strettamente correlata con il singolo ceppo, cosicchè non si possono fornire indicazioni di carattere generale.

I microrganismi degradanti possono crescere nel pesce cru-

do tenuto a lungo a temperature inadatte prima del congelamento o congelato lentamente, o scongelati lentamente o tenuti scongelati per troppo tempo. I fattori limitanti sono il tempo e la temperatura. Nessun microorganismo può crescere al di sotto di -10 -12°C tranne le muffe.

Di solito i microrganismi patogeni sono presenti in scarsa quantità e sono distrutti dal trattamento termico. Lo stesso succede con le tossine di Cl. botulinum. La temperatura è quindi il fattore principale che controlla l'attività microbica e l'analisi batteriologica fornisce alcune informazioni sulla qualità del pesce prima del congelamento. Il giudizio finale, basato sull'analisi microbiologica, deve tenere conto che la carica microbica ritrovata è inferiore a quella iniziale perchè molti ceppi muoiono in seguito al congelamento.

Crostacei cotti

Procedimento

I procedimenti di cottura possono essere: la sbollentatura a $95/100^{\circ}\text{C}$, la bollitura, la cottura sotto pressione (100°C e più). La durata della cottura è principalmente breve, perchè si cerca di minimizzare la perdita di qualità. La carne dei crostacei viene asportata manualmente oppure la

si separa mediante flottazione con salamoia.

Per aumentare la vita commerciale della carne si può precuocere a 77°C per 1'.

Degradazione

La cottura dei crostacei riduce significativamente la carica microbica e distrugge i germi sensibili. La separazione dei gusci dalla carne e gli altri tipi di lavorazione ricontaminano la carne e la flora microbica può essere costituita da Gram negativi ambientali come gli Achromobacter, gli Pseudomonas e da corineformi.

La qualità igienica di questi prodotti dipende dalle buone norme di lavorazione.

Oltre ai germi elencati, infatti possono essere presenti coliformi, E. coli, stafilococchi di origine umana.

Prodotti in scatola

I prodotti in scatola della pesca, presentano il problema della cosiddetta sterilità biologica o commerciale perchè il trattamento termico che si applica non sempre distrugge i germi presenti. Infatti per questi alimenti le temperature troppo elevate, cioè quelle normalmente impiegate per sterilizzare possono alterare i prodotti.

E' quindi ovvio che la presenza di germi delle scatole è

tollerabile se: il prodotto non è alterato; se non sono presenti tossine; se i germi non sono patogeni e non sono in grado di produrre tossine.

Semiconserve

Una grande quantità di prodotti della pesca sono conservati abbinando l'azione del calore (pastorizzazione) con quella dei conservanti, ma è l'Aw il fattore decisivo per la conservazione di questi prodotti.

In genere la flora batterica è bassa ed i prodotti si conservano bene a meno che non siano massivamente contaminati per errore.

Anche i prodotti della pesca affumicati si conservano a lungo. Il loro contenuto di umidità è troppo basso per permettere lo sviluppo dei germi patogeni e di quelli deterioranti. Caratteristica è la flora batterica costituita da Gram positivi; quando l'Aw è sufficientemente elevata, allora il prodotto può venire alterato dallo sviluppo dei Gram negativi.

Dal punto di vista igienico sanitario il rischio presentato dalle conserve di pesce è costituito dallo sviluppo di Cl. botulinum, ma il suo sviluppo è impedito dalla presenza di 4,1% di NaCl calcolato sulla frazione acquosa e da

un A_w inferiore a 0,98.

SCHEMA DI LAVORAZIONE DELLE CARCASSE DI POLLO

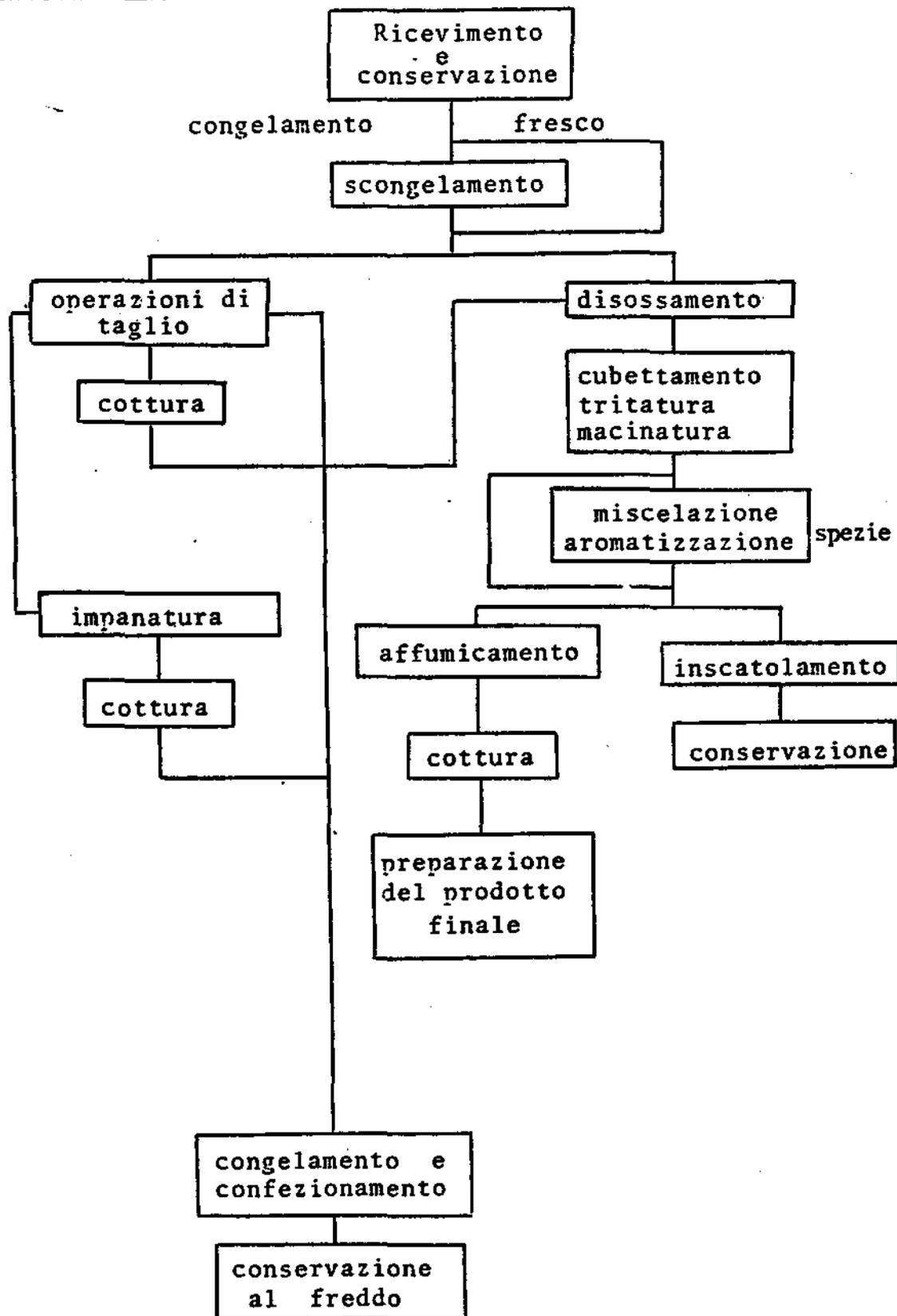


TABELLA n. 2:

Composizione media di carni di pesce e di molluschi

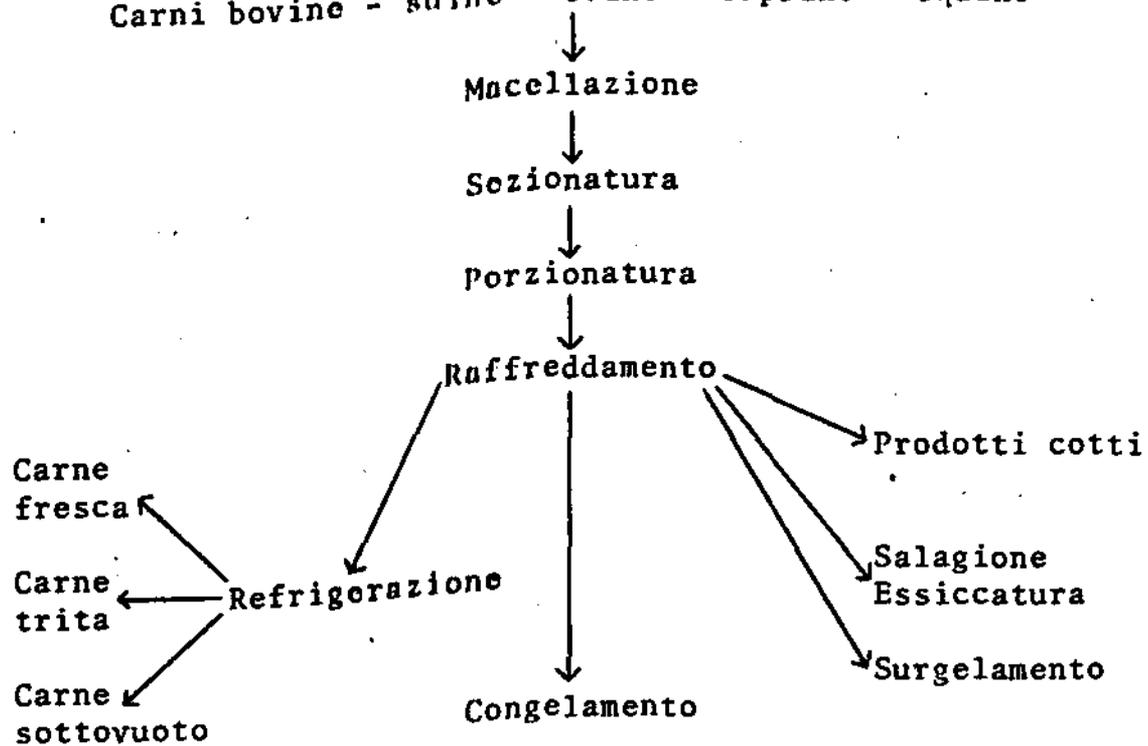
	Umidità %	Proteine %	Lipidi %	Generi %
Pesci grassi	68,6	20	10	1,4
Pesci semigrassi	77,2	19	2,5	1,3
Pesci magri	81,8	16,4	0,5	1,3
Crostacei	76,0	17,8	2,1	2,1
Molluschi	81,0	13	1,5	1,6

POSSIBILITA' DI CONTAMINAZIONE MICROBICA DURANTE LE FASI
DI LAVORAZIONE DEI PRODOTTI CARNEI

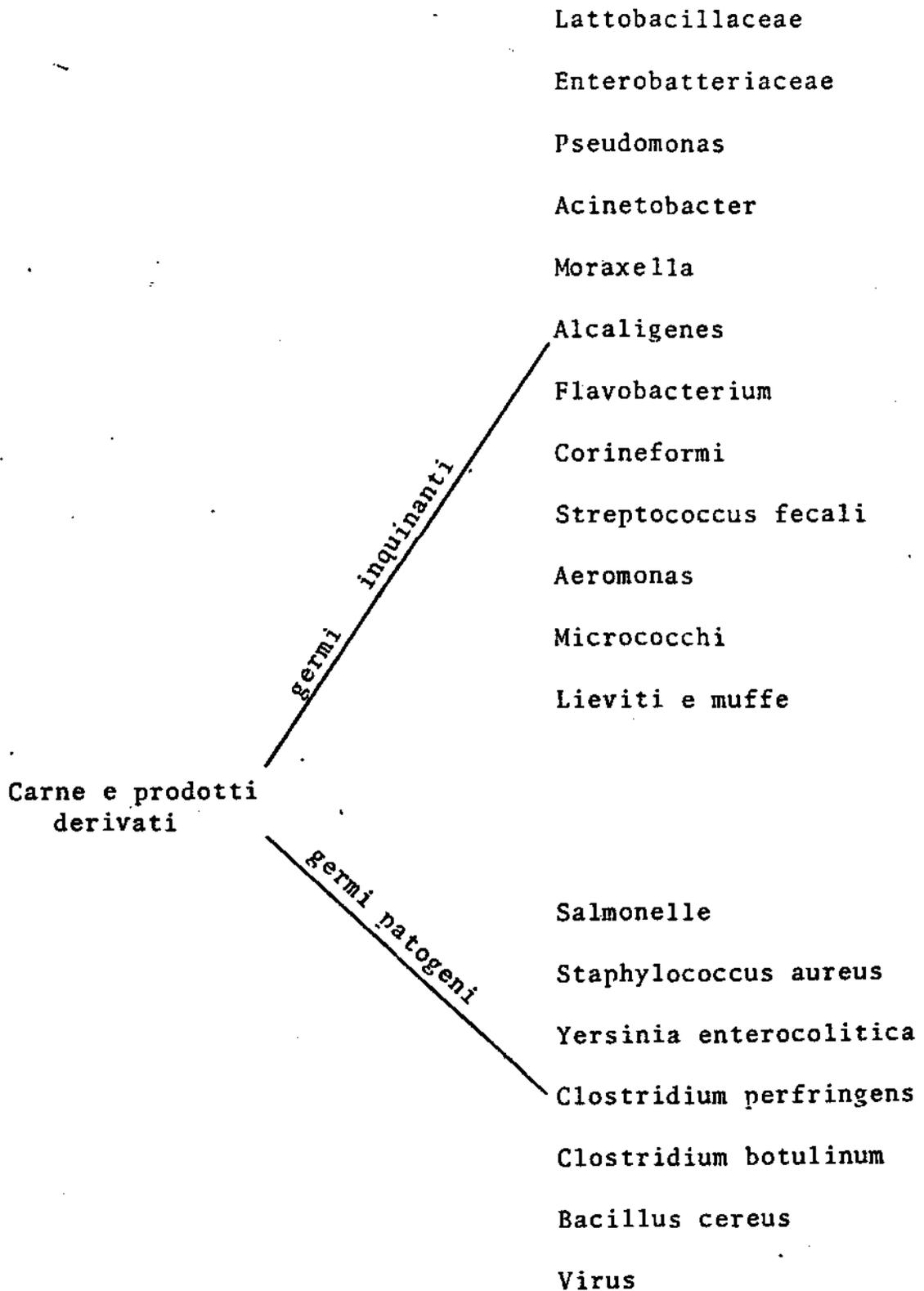
- 1) Qualità della materia prima.
- 2) Stato di manutenzione delle attrezzature e dei locali di lavorazione.
- 3) Attenta cura con cui si effettua la lavorazione.
- 4) Igiene del personale.
- 5) Temperatura degli ambienti di lavorazione.

PROCESSO DI LAVORAZIONE DURANTE IL QUALE E' POSSIBILE LA
INSORGENZA DI FOCOLAI DI CONTAMINAZIONE MICROBICA

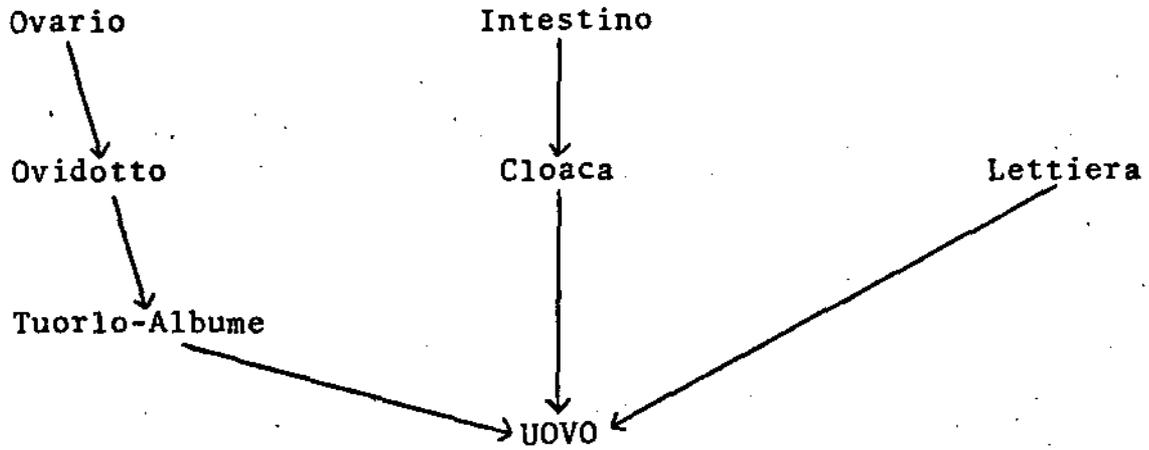
Carni bovine - suino - ovine - caprine - equine



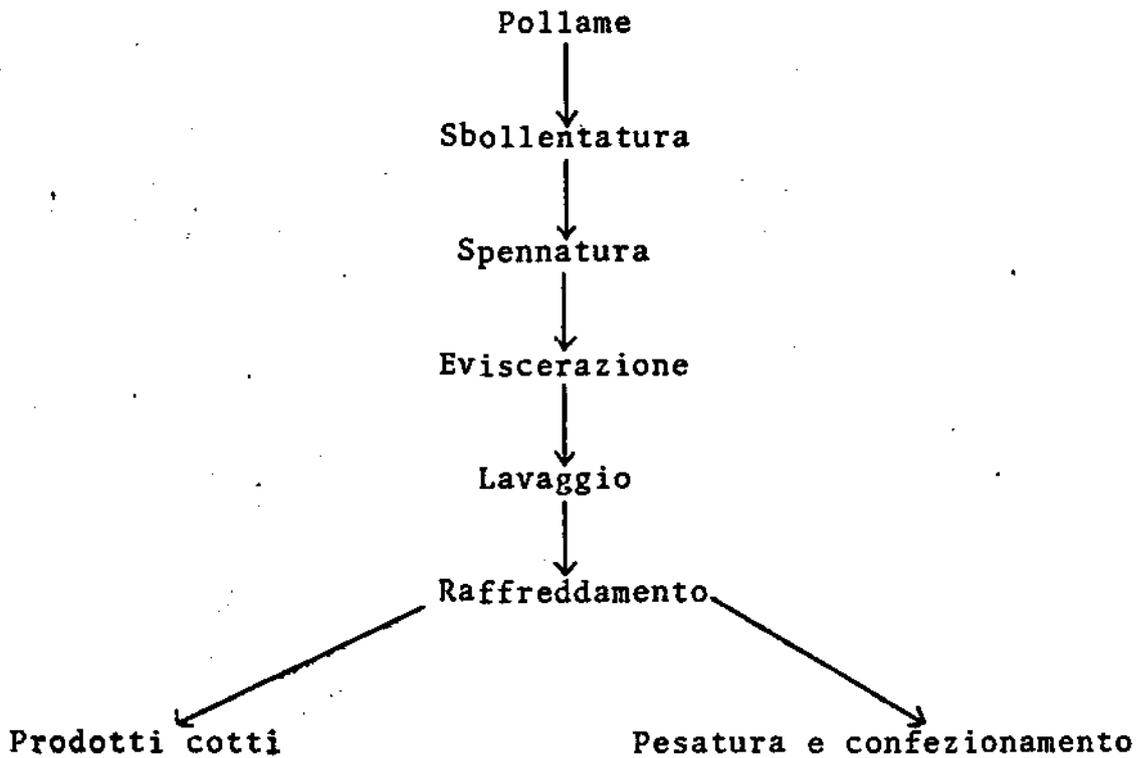
MICROORGANISMI RESPONSABILI DEI FOCOLAI DI CONTAMINAZIONE



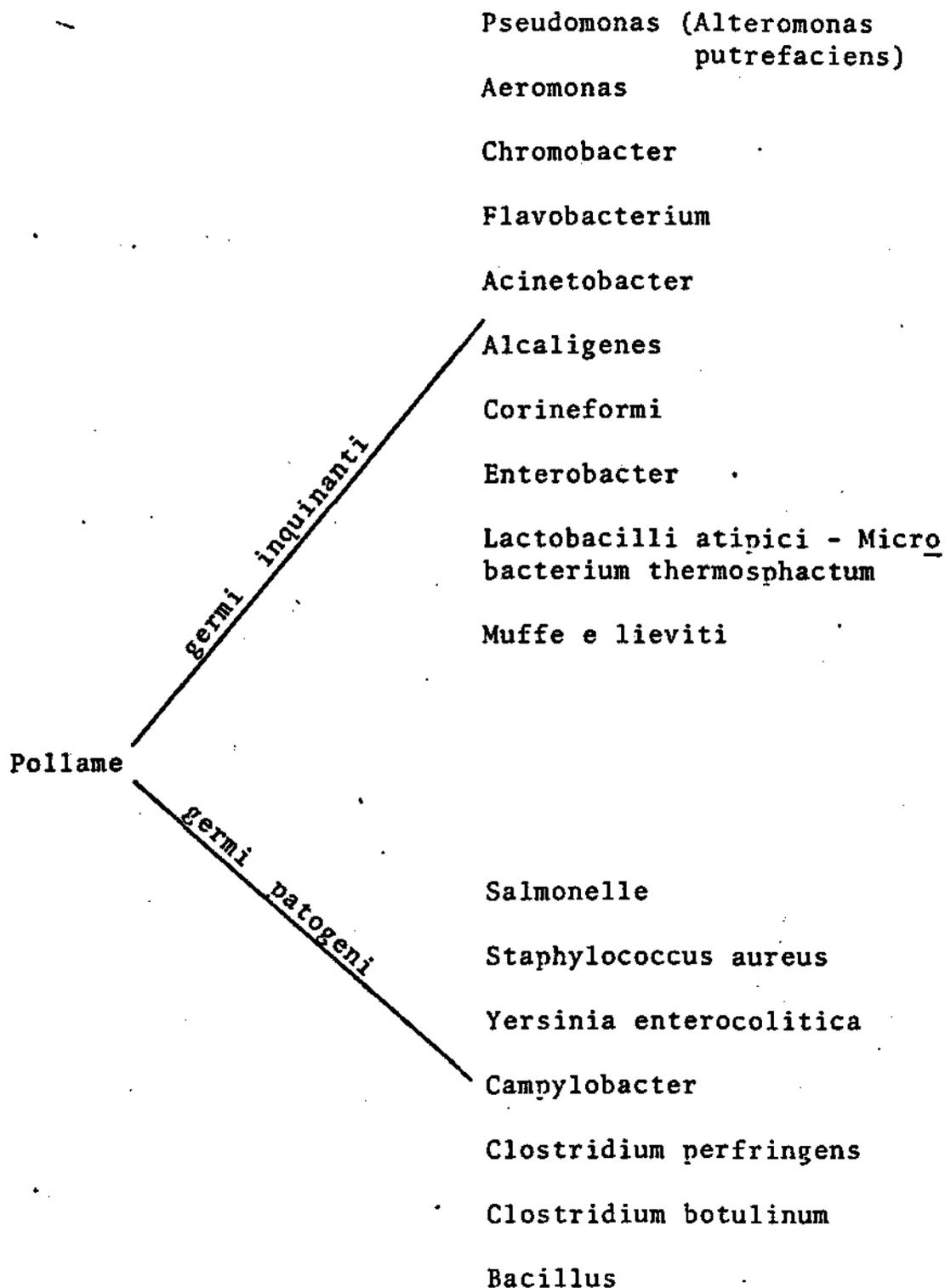
PASSAGGI DELL'UOVO DURANTE I QUALI E' POSSIBILE LA CONTAMINAZIONE MICROBICA



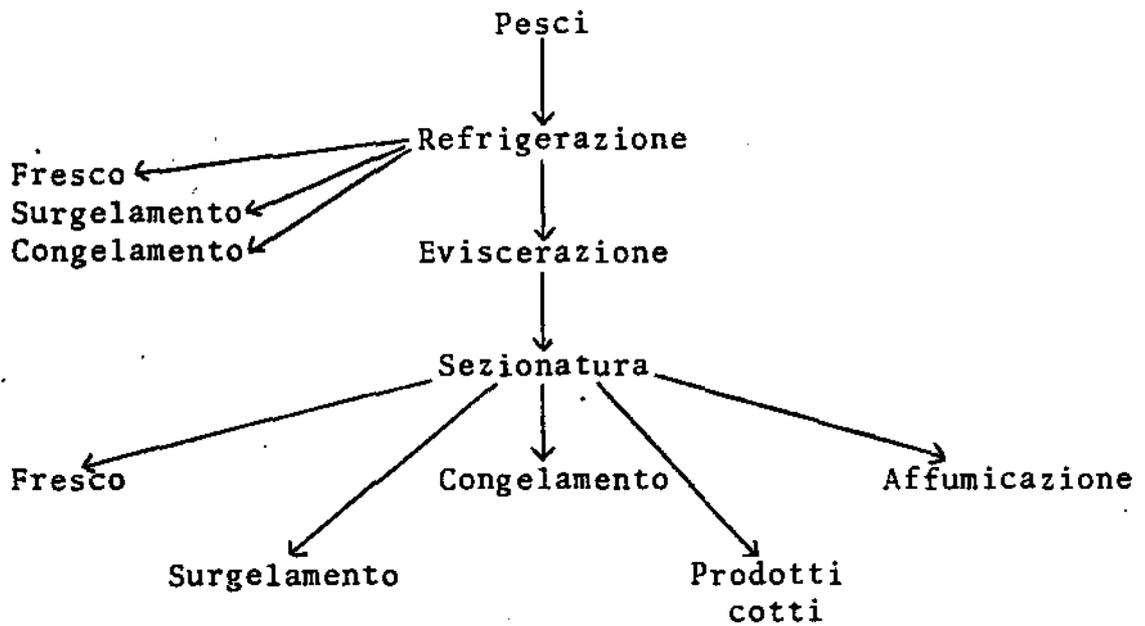
PROCESSO DI LAVORAZIONE DURANTE IL QUALE E' POSSIBILE LA
INSORGENZA DI FOCOLAI DI CONTAMINAZIONE MICROBICA



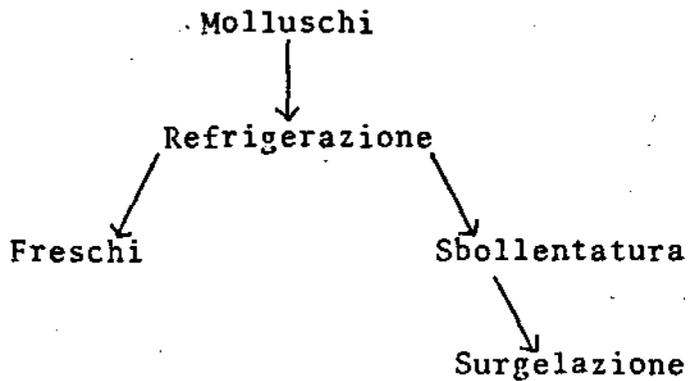
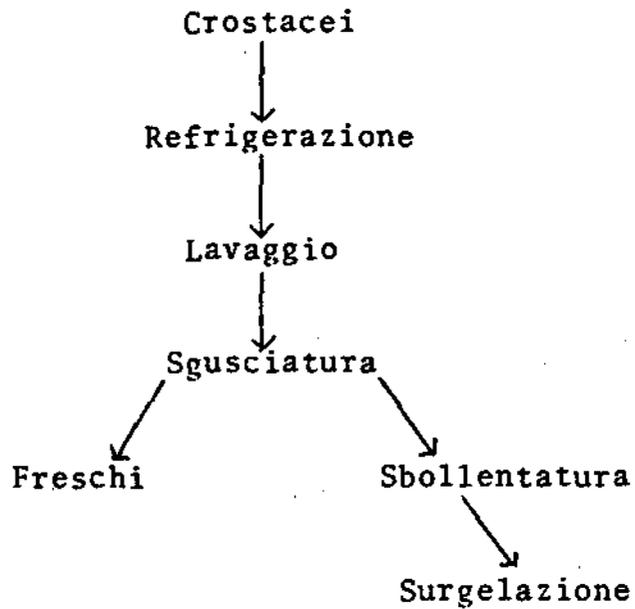
MICROORGANISMI RESPONSABILI DEI FOCOLAI DI CONTAMINAZIONE



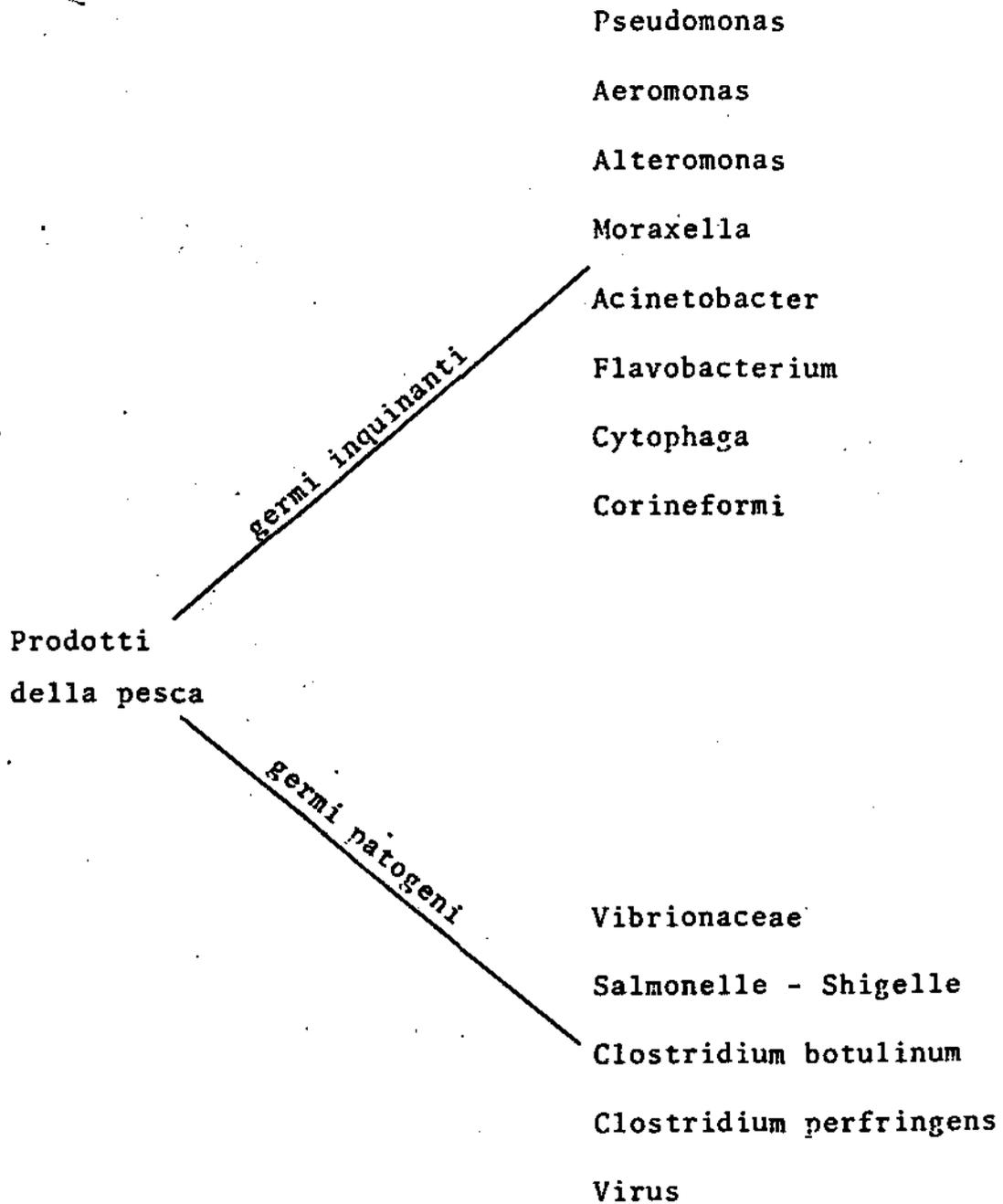
PROCESSO DI LAVORAZIONE DURANTE IL QUALE E' POSSIBILE LA
INSORGENZA DI FOCOLAI DI CONTAMINAZIONE MICROBICA



PROCESSO DI LAVORAZIONE DURANTE IL QUALE E' POSSIBILE LA
INSORGENZA DI FOCOLAI DI CONTAMINAZIONE MICROBICA



MICROORGANISMI RESPONSABILI DEI FOCOLAI DI CONTAMINAZIONE



TOSSINFEZIONI ALIMENTARI DA BIOTOSSINE MARINE

Dott.ssa LAURA VOLTERRA

Laboratorio di Igiene del Territorio - I.S.S.

Il consumo di molluschi, specialmente crudi, può essere all'origine di numerose malattie: batteriche (salmonellosi e colera), virali (epatite di tipo A), parassitarie (angiostrongilosi).

A parte, però, le suddette infezioni o infestazioni, l'ingestione di mitili e di particolari pesci può essere dannosa, poichè questi organismi possono, in particolari circostanze, contenere sostanze tossiche ed essere veicoli per l'uomo di tossinfezioni alimentari che causano manifestazioni soprattutto di indole neurologica (PSP=Paralytic Shellfish Poisoning; NSP=Neurotoxic Shellfish Poisoning; sindrome da tetrodotossine), ma anche che colpiscono l'apparato digerente umano (DSP=Diarrheic Shellfish Poisoning; Ciguatera).

La più nota intossicazione di questo tipo, connessa all'assunzione di frutti di mare, è il PSP. I sintomi di questa sindrome possono distinguersi in lievi, severi e acuti e vanno dalla cefalea e vomito fino alla paresi de-

gli arti e a difficoltà respiratorie gravi che possono condurre a morte i soggetti colpiti. Negli anni '20 Sommer e Meyer (1) in California, ne individuarono la causa in un'alga del genere Goniaulax, la quale produrrebbe una tossina, che si concentrerebbe nei molluschi filtratori. Tale tossina caratterizzata chimicamente come una tetraidropurina è stata chiamata saxitossina dal Saxidomus giganteus, mollusco dell'Alaska responsabile di casi di PSP.

Oggi la chimica dei veleni paralizzanti, responsabili della sindrome PSP si è complicata. Si tratta non di una sola tossina, bensì di un gruppo di tossine a cui appartengono, accanto alla più nota saxitossina, una serie di goniautossine (da I a VII), di cui una: la goniautossina III anche più tossica della stessa saxitossina (2,3). Tali composti sono comunque tutti idrosolubili, o meglio acido solubili (la loro massima solubilità si ha a pH 4), debolmente solubili in metanolo ed etanolo, completamente insolubili nei solventi polari.

Producono tossine che determinano PSP vari membri del phylum Dinophyta: per lo più le alghe incriminate appartengono al genere Goniaulax (G. catenella, tamarensis, excavata, acatenella, polyedra), ma anche al genere Pyrodinium (P. bahamense, phoneus) (4).

Il fenomeno del PSP è sempre associato alla comparsa di maree colorate: le acque del mare assumono una colorazione rossastra per la presenza di una certa concentrazione di queste alghe. Tale cambiamento di colore si registra quando la concentrazione dell'alga nella massa acquosa raggiunge il valore di $10^6/1$. Queste maree si possono verificare nel periodo che va da marzo a novembre ed inizialmente furono registrate solamente nelle zone tropicali e sub-tropicali dell'emisfero boreale (esattamente in una fascia compresa tra i 30° e i 60° di latitudine Nord) (5).

Oggi sono stati segnalati episodi di PSP anche in Malesia, Sud Africa, Venezuela e India, l'area più seriamente colpita è la costa del Pacifico: dalla California alle isole Aleutine. Segue il Nord Europa e il Nord America.

Le alghe responsabili della produzione delle tossine si concentrano massimamente nei molluschi filtratori, quali ad esempio i mitili, ma si possono anche trovare in molluschi carnivori, quali le lumache di mare. I molluschi filtratori accumulano veleno, direttamente, poichè sono capaci di filtrare grandi volumi di acqua. Le lumache, invece, accumulano tossine di seconda mano, poichè si cibano di bivalvi filtratori in cui le tossine possono essersi accumulate. Il veleno è distribuito diversamente nelle va-

rie parti del corpo ed è concentrato in organi diversi anche a seconda delle specie considerate (5) e delle stagioni. In estate il sito principale è l'epatopancreas, seguito dalle branchie e dalle gonadi, quindi dalla massa muscolare e dai sifoni. Col procedere delle stagioni, passando dall'autunno all'inverno la ghiandola digestiva si rimpicciolisce e perde conseguentemente veleno più rapidamente dalle branchie.

Si è detto che la concentrazione del veleno varia nei diversi organi dei molluschi, anche in funzione della specie: sebbene i sifoni rappresentino un organo con scarsa capacità concentrante nei confronti delle tossine del PSP, in un caso specifico, quello del Saxidomus giganteus sono proprio i sifoni il luogo preferenziale di accumulo.

Mentre i molluschi non risentono delle fitotossine responsabili del PSP, ma le trasmettono all'uomo che se ne ciba, sono stati segnalati episodi di morie di zooplancton e di pesci in cui la morte poteva essere associata alla presenza nel tubo digerente di alghe tossiche dinoflagellate del genere Goniaulax. Tuttavia, secondo alcuni autori, gli animali a sangue freddo sarebbero abbastanza insensibili agli effetti della tossina. Non così gli animali a sangue caldo come: galline, piccioni e gatti (5). Nel-

l'ultimo decennio sono stati registrati due episodi di morte di uccelli che si erano cibati di pesci che avevano assunto l'alga Goniaulax excavata (6). Gli uccelli in questione, tra cui cormorani e gabbiani, presentavano lesioni patologiche che includevano infiammazione dell'apparato digerente ed emorragie cerebrali.

Le sindromi da PSP crescono di anno in anno. Si è calcolato che nel periodo 1970-1974 la sindrome da PSP ha rappresentato il 5,4% di tutte le tossinfezioni da biotossine che hanno interessato l'uomo e che potevano essere correlate con la ingestione di mitili.

Durante il mese di ottobre del 1976 anche in Italia e parallelamente in Francia e in Ispagna si sono verificati alcuni casi di PSP. Si trattava di mitili provenienti da impianti di allevamento ubicati nei rias della Galizia e importati in Italia nel periodo settembre-aprile, quando si ha praticamente una interruzione pressochè totale della produzione nazionale di tali molluschi. Nessun caso in quella circostanza fu letale (7).

Una sindrome analoga al PSP e sempre connessa con il consumo di molluschi è l'NSP (Neurotoxic Shellfish Poisoning). La sintomatologia per l'uomo è meno acuta di quel

la del PSP: i sintomi di intossicazione si manifestano dopo 3 h dalla ingestione e sono caratterizzati da parestesie, vomito, diarrea, ma non vi è mai paralisi respiratoria. Casi di paralisi respiratoria si possono verificare solo per esposizione diretta ad aerosol delle cellule algali responsabili della produzione della tossina. Tali casi sono stati indotti sperimentalmente in laboratorio.

Anche qui è una dinoflagellata l'alga produttrice della componente tossica: il Gymnodinium breve.

Fioriture di G. breve si osservano periodicamente (ogni 3-4 anni) nel periodo estivo autunnale in zone specifiche: una di queste aree è la Florida (8). Le fioriture sono associate a massicce morie di pesci, anche della specie più resistenti: quali, ad esempio, il Mugil cephalus. I pesci perdono il senso dell'equilibrio e una volta morti non presentano alcuna lesione patologica (9).

Conseguentemente alle morie di pesci si registrano anche morie di uccelli che si nutrono dei pesci contaminati.

La differenza di azione dei due gruppi di tossine responsabili dell'NSP e del PSP può essere spiegata con la natura dell'agente tossico. Infatti, mentre per i casi di PSP le dinoflagellate incriminate sono tutte tectate, nel caso dell'NSP si tratta di una dinoflagellata nuda. La

cellula è talmente fragile che si rompe al passaggio attra verso le branchie del pesce, rilasciando così le tossine che rapidamente vengono portate in circolo dal sistema sanguigno, con le ben note conseguenze letali.

La natura delle tossine elaborate dal G. breve non è ancora del tutto nota: si tratta sempre di un gruppo di tossine liposolubili, non aromatiche, non proteiche (10).

Un'altra tossinfezione alimentare da biotossine algali è la ciguatera. Essa è conseguente al consumo di pesci che vivono nelle barriere coralline e che possono con tenere nelle loro carni e nei loro visceri veleno. Interessa l'emisfero australe e parte di quello boreale in una latitudine compresa tra i 35° di latitudine Nord e i 35° di latitudine Sud. La malattia, nota fino dal 1600 come ciguatera, ha dato il nome alla tossina: ciguatossina.

Chimicamente la tossina è un lipide con un azoto quaternario, uno o più gruppi idrossilici e un ciclopentanone centrale (11).

La ciguatera è caratterizzata da una sindrome intesti nale (crampi, nausea, vomito, diarrea acquosa), che solo in pochi casi può condurre a morte.

Nel quadriennio 1970-1974 su 184 casi riconosciuti di

ciguatera in U.S.A. nessuno risultò mortale. In questi ultimi casi la sindrome intestinale era associata a ipotensione e a paralisi respiratoria.

La tossina che si accumula nei pesci è prodotta presumibilmente da una alga: Gambierdiscus toxicus, una dinoflagellata tecata, che vive nelle barriere coralline attaccata a macroalghe (12). Più di 400 specie di pesci ossei che si cibano di alghe o dei detriti rinvenuti nelle barriere coralline possono essere portatori di ciguatossina per l'uomo. Le concentrazioni più alte di tossina si trovano nel fegato e nei visceri, ma non tutti i pesci di una stessa popolazione contengono un egual livello di tossina. Questo infatti è funzione delle abitudini alimentari individuali di ciascun soggetto.

Un'altra intossicazione alimentare correlabile al consumo di frutti di mare è il DSP (Diarrheic Shellfish Poisoning). L'intossicazione è caratterizzata da diarrea, nausea, vomito e dolori addominali. I sintomi si manifestano da 30 minuti a poche ore dall'ingestione (13). Si contrae cibandosi di molluschi che si siano sviluppati in aree in cui si sono registrate fioriture di dinoflagellate tecate: Dinophysis fortii o D. acuminata e varie spe-

cie di Prorocentrum (P. micans, lima, redfieldii)(13,14).

La natura chimica delle sostanze prodotte da queste alghe è acido oxadaico o suoi derivati (15).

Tra le biotossine marine che possono interessare lo uomo la tetrodotossina è l'unica che non è prodotta da alghe. Si tratta, in tal caso, di un metabolita elaborato da alcuni pesci della famiglia Tetrodontidae, che si accumula nei visceri e nella carne di questi organismi.

La quantità di tossina rinvenibile è variabile in funzione dei cicli biologici: è massima all'inizio dell'estate prima della fregola.

I sintomi prodotti sull'uomo dalla tetrodotossina sono analoghi a quelli della saxitossina e conducono a morte più del 50% degli individui colpiti.

La sostanza tossica è una aminoperidroquinazolina e campioni di pesce ne possono contenere da 0,5 a 30 mg/Kg di peso umido di carne.

In Italia si sono osservati 10 casi di intossicazione da tetrodotossina con 3 esiti fatali, a seguito di consumo di prodotti surgelati provenienti da Taiwan (16).

1. MEYER K.E., SOMMER K.F., SCHOENHOLZ P.- (1923) Mussel poisoning. J. Prevent. Med. 2: 365-394.
2. SHIMIZU Y., HSU C., FALLON W.E., OSHIMA Y., MIURA I., NAKANISHI K.- (1978) Analysis of toxic mussels (Mytilus sp.) from the Alaskan inside passage. Agr. Fd. Chem. 26: 878-881.
3. SCHANTZ E.J. (1980) Phycotoxins from dinoflagellates, In: Krogh P. ed. IV IUPAC Symposium on Mycotoxins, Pure Appl. Chem. 52: 183-188.
4. HARADE T., OSHIMA Y., KAMIYA H., YASUMOTO T. - (1982) Confirmation of paralytic shellfish toxins in the dinoflagellate Pyrodinium bahamense var. compressa and bivalves in Palau. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish 48: 821-825.
5. PRAKASH A., MEDCOF J.C., TENNANT A.D. - (1971) Paralytic shellfish poisoning in Eastern Canada. Bulletin 177. Fish. Res. Board Canada, Ottawa.
6. ARMSTRONG I.H., COULSON J.C., HAWKEY P., HUDSON M.M.- (1978). Further mass seabird deaths from paralytic shellfish poisoning. Br. Birds 71: 58-68.
7. VIVIANI R., PROJA M., D'ALESSANDRO F., MANCINI L., POLETTI R., MONTANARI G. - (1977) Primi casi in Italia di "Paralytic Shellfish Poisoning" da mitili provenienti

dalla Spagna. 1-27.

8. STEIDINGER K.A. - (1975) Implications of dinoflagellate life cycles on initiation of Gymnodinium breve red tides. Environm. Lett. 9: 129-139.
9. ABBOTT B.C., SIGER A., SPIEGELSTEIN M. - (1975) Toxins from blooms of Gymnodinium breve In: Lo Cicero V.R., ed. Proceedings of the first International Conference on Toxin Dinoflagellate Blooms; Makefield, Massachusetts Science and Technology Foundation, 355-365.
10. BADEN D.G., MENDE T.J. - (1982) Toxicity of two toxins from the Florida red tide marine dinoflagellate, Pyrodiscus brevis. Toxicon 20: 457-461.
11. SCHEUER P.J., TAKAHASHI W., TSUTSUMI J., YOSHIDA T. - (1967) Ciguatoxin: isolation and chemical nature. Science 155: 1267-1268.
12. BAGNIS R., CHANTEAU S., CHUNGUE E., HURTEL J.M., UASUMOTO T., INONE A. - (1980) Origins of ciguatera fish Poisoning: a new dinoflagellate, Gambierdiscus toxicus Adachi and Fukuyo, definitively involved as a casual agent. Toxicon 18: 199-208.
13. KAT M., SPEUR J., OTTE P.F. - (1982) Diarrhetic mussel poisoning in the Netherlands related to the occurrence of Dynophysis acuminata, September-October, 1981. In-

ternational Council for the Exploration of the Sea, C.
M. 1982/E: E, 1-6.

14. YASUMOTO T., OSHIMA Y., SUGAWARA W., FUKUYO Y., OGURI H., IGARASHI T., FUJITA N. - (1980) Identification of Dynophysis fortii as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. Bull. Jap. Soc. Fish 46: 1405-1411.
15. MURAKAMI T., OSHIMA Y., YASUMOTO T. - (1982) Identification of oxadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate Prorocentrum lima. Bull. Jap. Soc. Fish. 48: 69-72.
16. POCCHIARI F. - (1977) Trade of misbranded frozen fish: medical and public health implications. Ann. Ist. Super. Sanità 13: 767-772.

MONITORAGGIO MICROBIOLOGICO A LIVELLO DI LOCALI, ATTREZZATURE
E PERSONALE NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE.

Dott. Leucio OREFICE
Laboratorio di Alimenti - I.S.S.

Il mantenimento e il controllo dell'igiene nell'industria alimentare sono resi più agevoli se in origine i locali, le apparecchiature e gli utensili sono progettati e realizzati in maniera adeguata.

Quanto più l'ambiente concorre alla facilità del mantenimento della pulizia, tanto più è facile che il grado di pulizia richiesto venga attuato e mantenuto. Tuttavia anche in presenza di una buona progettazione delle strutture e soprattutto in mancanza di questa, si richiede una adeguata sorveglianza sanitaria per impedire che le molteplici attività collegate con la produzione e distribuzione degli alimenti possano anche essere causa di contaminazioni microbiche indesiderate. Queste ultime, come è noto, sono quelle che si riflettono sul deterioramento della qualità del prodotto finito e quelle che sono causa di pericolo per la salute pubblica.

La sorveglianza, perché risulti efficace, dovrà essere attuata sia a livello dell'ambiente di lavoro (locali, superfici varie, utensili e macchinari) che a livello del personale addetto.

A) AMBIENTE DI LAVORO

Le fonti ambientali che hanno un ruolo predominante nella contaminazione dei prodotti alimentari sono:

- 1) L'aria confinata, con la polvere in essa sospesa, alla quale l'alimento può essere esposto per un periodo più o meno lungo;
- 2) le superfici che entrano in contatto diretto con l'alimento;

3) l'acqua impiegata per la pulizia o comunque nei processi di produzione.

1)ARIA

Vari autori hanno dimostrato come la carica microbiotica presente nell'aria può rivestire, oltre certi limiti, un ruolo significativo nel modificare le caratteristiche microbiologiche di alcuni tipi di alimenti (1) (2) (3).

Noi stessi abbiamo condotto una serie di indagini i cui risultati ci hanno indotto a confermare tale conclusione (4).

Da tali indagini è emerso, tra l'altro, che il valore della carica microbica dell'alimento esposto è correlato a fattori quali la ricettività dell'alimento stesso (valori di pH, presenza di spezie, carica microbica "all'origine" ecc), il contenuto microbico dell'aria, il tempo di esposizione, il rapporto superficie esposta/peso dell'alimento, i valori di A_w di superficie rilevabili nell'alimento stesso durante l'esposizione. Inoltre la accertata presenza di stafilococchi coagulsi-positivi in misura non trascurabile in campioni di carne e derivati del latte originariamente esenti ed esposti ad aria altamente micribizzata per un tempo sufficiente, ci ha dimostrato la possibilità di riproduzione di tali germi nelle condizioni sperimentali attuate e la possibilità del raggiungimento di concentrazioni prossime a quelle necessarie per provocare una tossinfezione alimentare.

Da quanto esposto emerge l'importanza di attuare un monitoraggio delle condizioni microbiologiche dell'aria negli ambienti di produzione degli alimenti.

Per quanto concerne la scelta del metodo, lo studio comparativo di diversi sistemi di captazione da noi condotto ha evidenziato la superiorità dei sistemi ad impatto forzato che fanno

uso di apparecchi ad aspirazione di volumi noti d'aria, rispetto al tradizionale sistema che si affida alla sedimentazione spontanea dei microorganismi.

Vi è solo una grossolana relazione tra contenuto microbico per unità di volume d'aria e microorganismi che si depositano su una superficie orizzontale nell'unità di tempo, a causa della notevole dipendenza della sedimentazione dai movimenti dell'aria più lievi.

I dati ricavati con il sistema della sedimentazione spontanea, espressi in u.f.c./dm²/ora, possono tuttavia risultare interessanti, se sufficientemente estesi nel tempo, in quanto correlati ai processi di sedimentazione che si verificano su analoghe superfici di un alimento all'aria. I metodi che impiegano il gorgogliamento in terreno liquido, la precipitazione elettrostatica e la precipitazione termica presentano più inconvenienti che vantaggi (5) e pertanto non li prenderemo in considerazione.

Nella scelta di un campionatore ad aspirazione appare conveniente dare la preferenza ad apparecchi maneggevoli, autonomi rispetto alla disponibilità di un impianto elettrico, rapidi nella esecuzione del prelievo. Tale ultima caratteristica si può riflettere sulla limitazione dello stress disidratativo delle cellule captate, con conseguenti conteggi microbici più elevati a parità di volume d'aria prelevato.

Gli apparecchi R.C.S. (Biotest-Milano) con fogli di terreno di coltura pronti e S.A.S (P.B.I. -Milano) rispondono a tali requisiti. In quest'ultimo l'aria confinata, aspirata attraverso una superficie forellata, viene convogliata su una piastra Petri contenente un terreno nutritivo specifico per i microorganismi che si intendono ricercare. Trascorso il tempo

di campionamento, la piastra viene rimossa e posta ad incubare.

Successivamente si conta il numero di colonie presenti sulla piastra e, poiché sono noti la portata dell'apparecchio (1 m^3 in 5'30") e il tempo di campionamento, si calcola il numero di u.f.c. per metro cubo d'aria.

I punti di prelievo e la frequenza dei campionamenti vanno studiati caso per caso. In linea di massima è consigliabile montare l'apparecchio su uno stativo che consente il collocamento stabile a varie altezze dal suolo, orientare opportunamente l'apparecchio stesso ed uniformare le condizioni di prelievo nei diversi campionamenti che si effettuano ad intervalli di tempo. Una maggiore frequenza di campionamenti potrà essere prevista nei locali nei quali esiste una notevole umidità delle superfici (ivi compresi i pavimenti), un'alta umidità relativa, la presenza di irregolari correnti d'aria.

Particolare attenzione andrà posta alle zone situate in prossimità delle aree di lavorazione e delle eventuali griglie di entrata e di uscita dell'aria condizionata. Per facilitare le operazioni di monitoraggio, specie nei casi di carenza di personale, si può adottare il sistema MM-3 (PBI-Milano) il cui principio di funzionamento è perfettamente analogo a quello del S.A.S. Tale sistema fornisce la possibilità di controllare automaticamente il contenuto microbico dell'aria mediante una unità a microprocessore, la quale permette di effettuare tre campionamenti ai tempi programmati, in assenza dell'operatore.

Il giudizio igienico, sulla base dei dati raccolti, potrà essere formulato solo dopo aver svolto un lavoro preliminare inteso ad accertare i limiti di accettabilità in ogni singolo ambiente, relativamente alla carica batterica totale e a quella micetica, nonché ad eventuali altri microorganismi specifici più o meno rilevanti. In alcuni casi occorre tenere presente che gli alimenti stessi, per la loro particolare natura,

divengono fonte di diffusione microbica nell'ambiente, dando luogo all'istaurarsi di un vero e proprio ciclo alimento-ambiente.

A puro titolo indicativo possiamo dire che, relativamente ai valori della carica totale dei mesofili aerobi, in locali adibiti a lavorazioni sterili si riscontrano mediamente 10 ± 100 u.f.c./m³, in locali adibiti a lavorazioni diverse di semilavorati 100 ± 500 u.f.c./m³, in locali particolari adibiti a lavorazioni che comportano un ciclo alimento-ambiente (es. lavorazione insaccati, formaggi ecc) 500 ± 1500 u.f.c./m³.

2) SUPERFICI

La sorveglianza igienica delle superfici di lavoro riveste particolare importanza specie quando l'alimento in produzione non subisce un trattamento termico finale o non è esclusivamente destinato alla cottura. E' stato dimostrato che la pulizia inadeguata di superfici di lavoro, nastri e rulli di trasporto può comportare un incremento della carica microbica superficiale del prodotto finito anche di un centinaio di volte! (6). Risulta quindi conveniente che tali superfici non presentino punti difficili da raggiungere con le operazioni di pulizia e disinfezione, né zone di facile accumulo di sporcizia (angoli non raccordati, rivestimenti discontinui con fessure, giunti a scarsa tenuta, ecc). Particolare cura è da dedicare alla bonifica dei raccordi e delle guarnizioni interposte lungo circuiti di alimentazione o di smistamento dell'impianto. In tali punti infatti si possono annidare ammassi batterici dotati di elevata resistenza verso i detergenti ed i disinfettanti abitualmente impiegati.

Da tali ammassi possono saltuariamente staccarsi "gettate" batteriche che penetrando nell'impianto, causano saltuari ed imprevedibili inquinamenti. Sono pertanto da evitarsi materiali porosi, e occorre dare la preferenza a sistemi di giuntaggio ad incastro costruiti in acciaio inossidabile o in resine particolari.

Le superfici, le tubature, i raccordi, ma anche gli utensili e le par

ti di apparecchiature che vengono in contatto con gli alimenti in produzione devono dunque essere sottoposti a procedimenti di lavaggio e di bonifica almeno una volta al giorno, al termine del turno lavorativo. La scelta del disinfettante deve essere subordinata alla realizzazione di differenti esigenze, quali l'ampio spettro d'azione, la bassa tossicità, l'azione in presenza di residui di sostanze organiche, la scarsa aggressività verso i materiali: i tensioattivi anfoteri, ad esempio, si sono dimostrati assai utili perché rispondono a tutti questi requisiti.

Il problema del monitoraggio microbiologico a livello delle superfici di lavoro, degli utensili, dei macchinari, consiste nell'individuare "valori soglia" che non devono essere superati nel corso della lavorazione e nel determinare, al termine del turno lavorativo, l'efficacia dei trattamenti di detersione - disinfezione che sono stati applicati. E' opportuno tenere conto dell'alta frequenza con la quale si concentrano sulle superfici di lavoro, nel corso della produzione di alcuni alimenti, elementi batterici in misura tale da superare la soglia critica di circa 50-100 u.f.c./cm².

Valori di alcune centinaia di batteri /cm² possono non riuscire allarmanti e costituire un reperto che non pregiudicherebbe la salubrità dell'alimento.

Pertanto, nella determinazione della carica microbica totale delle superfici di lavoro quando è già iniziata la produzione è sconsigliabile adoperare metodi per impronta con terreni agarizzati nutritivi, a causa della facilità con cui si evidenzerebbe una confluenza delle unità formanti colonie.

Si può dunque ricorrere a vari metodi che comportano una asportazione dei microbi dalle Superfici e una loro successiva

dispersione in opportuni diluenti che vanno successivamente piastrati.

Il metodo dei tamponcini di cotone non risulta sufficientemente riproducibile e pertanto andrebbe evitato (7), comunque è da considerarsi anche il fatto che i metodi fanno uso di supporti da premere semplicemente sulla superficie da esaminare senza strofinamento, permettono un basso recupero dei microorganismi realmente presenti, in taluni casi appena lo 0,1% -1% (8). Tenendo conto di ciò stiamo cercando di migliorare una metodica il cui principio si basa sull'uso di tamponi di agar che vanno successivamente omogeneizzati (9).

Il metodo di lavaggio tradizionale nei sacchetti di plastica sterile può essere impiegato per piccoli utensili dalle superfici irregolari, d'altra parte piccole superfici, che per la loro forma possono contenere liquidi senza disperderli, possono essere "esplo-rate" con soluzioni di lavaggio che vanno poi recuperate.

Nel caso di superfici lisce orizzontali può essere opportunamente impiegato il metodo di lavaggio con l'apparecchio elettrico prescritto per il monitoraggio della microflora cutanea.

Il controllo delle parti poco accessibili degli impianti e delle apparecchiature andrà effettuato in occasione dello smontaggio per operazioni periodiche di pulizia o di manutenzione.

Al momento di valutare l'efficacia dei trattamenti di deter-sione-disinfezione applicati al termine del turno lavorativo, risultano utili i tamponi contenenti terreni agarizzati nutritivi, purché si incorpori in essi una opportuna soluzione neutralizzante i residui di disinfettante.

Le sostanze più comunemente contenute in tale soluzione sono la lecitina di soia, il polisorbato 80, il sodio tiosolfato, la L-istidina.

Ancora utili, per la loro praticità, risultano i tamponi a base di terreni agarizzati selettivi per la ricerca di germi particolarmente significativi (ad esempio enterobatteri, pseudomonadacee, stafilococchi coagulasi-positivi, streptococchi fecali ecc.). Dopo avere isolato le colonie sospette occorre sottoporle a test biochimici o sierologici per procedere ad una conferma della loro natura. Ad esempio, per la determinazione delle salmonelle si possono adoperare tamponi di agar-desossicolato e saggiare le colonie sospette con una kit di test per enterobacteriacee (come il Minitex system).

Considerata la estrema variabilità dei conteggi nelle diverse situazioni sperimentali, è opportuno, ai fini dell'individuazione di particolari situazioni critiche, standardizzare le procedure analitiche e seguire nel tempo i valori derivanti da numerosi campionamenti ripetuti negli stessi luoghi. Occorre poi porre in relazione tali valori con le eventuali variazioni dei parametri microbiologici degli alimenti che vengono a contatto con le varie superfici esaminate.

Solo allora si potranno stabilire "valori accettabili" validi nella situazione specifica, ed adottare gli opportuni interventi quando questi valori vengono superati.

3)ACQUA

Nell'ambito dell'igiene della produzione non é da trascurare la qualità microbiologica dell'acqua utilizzata sia per il funzionamento e per la pulizia degli impianti che addizionata a componenti dell'alimento durante le varie fasi della lavorazione.

Risulta evidente che per tale fabbisogno dovrà essere impiegata acqua idonea dal punto di vista batteriologico, al fine di evitare contaminazioni la cui origine viene spesso ignorata.

Necessita quindi un monitoraggio microbiologico costituito

controlli da frequenti, in numero maggiore nella stagione calda, a livello dell'ingresso nello stabilimento della rete di distribuzione, all'uscita dei serbatoi interni, in corrispondenza di alcuni punti dei circuiti di alimentazione nella catena di lavorazione.

La cadenza minima dei controlli dovrebbe essere stagionale, con intensificazione in caso di segnalazione di situazioni critiche, e tali controlli dovrebbero prevedere almeno la valutazione della carica microbica saprofitaria a 37°C e a 20°C, nonché la ricerca dei germi indici di inquinamento fecale.

B) PERSONALE ADDETTO

In una industria alimentare non può essere sottovalutato l'apporto microbico proveniente dalla cute e dagli indumenti del personale addetto alle varie fasi della lavorazione, specie quando quest'ultima prevede una diretta manipolazione degli alimenti.

Il materiale biologico che si origina dalla desquamazione dello strato corneo, contenente microorganismi appartenenti a varie specie, può venire in contatto con gli alimenti sia in modo diretto che in modo indiretto, attraverso le superfici di lavoro sulle quali si deposita. E' noto che vi sono notevoli variazioni individuali quali-quantitative dei batteri cutanei, legate al pH locale, alla composizione in acidi grassi delle secrezioni, alla temperatura ecc.; vi sono altresì variazioni nella facilità con cui tali batteri vengono diffusi nell'ambiente. E' stato accertato ad esempio che vi sono alcuni soggetti sui cui polpastralli si riscontrano conteggi batterici costantemente elevati (10).

Non raramente, e in maggiore misura nei portatori rino-

faringei, può essere reperito *S. aureus* (11), la cui cessione dalla cute può riscontrarsi seppure in minor quantità anche dopo un ordinario lavaggio delle mani con sapone detergente (12).

Sulla cute possono poi essere trovati vitali numerosi batteri Gram-negativi come *E. Coli*, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.* (13)(14). I pericoli maggiori derivano proprio dai portatori sani che diffondono i microorganismi senza manifestare uno stato di malattia, quindi passano inosservati: essi possono avere importanza anche nei casi di ricontaminazione di prodotti che hanno subito un trattamento tecnologico di bonifica.

Tenuto conto di queste premesse, è utile servirsi di una metodologia idonea per un monitoraggio microbiologico delle superfici cutanee al fine di rilevare potenziali fonti di inquinamento microbico di origine non ambientale.

Alcune osservazioni fatte per la determinazione della carica batterica totale delle superfici di lavoro, valgono anche in questo caso. E' pertanto opportuno disporre di un metodo che preveda l'allontanamento dei microorganismi dalla cute e la loro successiva dispersione in opportuni diluenti. A questo scopo si è dimostrato particolarmente efficace, in una serie di prove da noi condotte, il metodo di lavaggio con apparecchio elettrico ideato da J. Fleurette ed M.J. Transy (15) che consiste in un miglioramento della tecnica di lavaggio proposta da Williamson e Kligman (16).

Scelta l'area cutanea da esaminare, generalmente sulla faccia palmare della mano o sull'avambraccio, vi si appoggia un piccolo cilindro di vetro sterile aperto da entrambi i lati, nel quale vanno posti 2ml circa di una idonea soluzione di lavaggio

La tenuta del liquido è assicurata dalla pressione che si esercita sul cilindro stesso.

Successivamente si introduce nel cilindro una paletta sterile flessibile, collegata ad un piccolo motore, che va fatta ruotare a contatto con la cute per circa 15 secondi. Quindi si preleva il liquido di lavaggio e lo si piastra, opportunamente diluito, negli idonei terreni colturali.

La ricerca dei microorganismi con tamponi agarizzati nutritivi andrebbe limitata all'uso di terreni selettivi per la ricerca di germi specifici indicatori di inquinamento fecale e/o patogeni.

Le determinazioni andrebbero condotte su un'aliquota significativa del personale, sia all'inizio del turno lavorativo che a metà ed al termine dello stesso.

Inoltre andrebbe studiato l'effetto di alcune situazioni particolari come l'uso della toilette durante il turno lavorativo e la pratica dell'ordinario lavaggio delle mani. In quest'ultimo caso le determinazioni condotte prima e dopo la pulizia dovrebbero mettere in evidenza l'entità dell'abbattimento microbico, e tale dato, se ritenuto insoddisfacente, dovrebbe suggerire opportune modifiche della procedura stessa del lavaggio. I controlli microbiologici andrebbero intensificati negli addetti che presentano processi infiammatori cutanei, orali o delle prime vie aeree, anche se di entità modesta, poiché i risultati delle indagini potrebbero suggerire opportuni provvedimenti di bonifica.

CONCLUSIONE

La problematica del monitoraggio microbiologico nella industria alimentare è alquanto complessa, in quanto comporta

la codificazione su base sperimentale di una serie di svariati fattori che possono influire "a monte" sull'aspetto igienico del prodotto finito. I dati ottenuti sono correlati ad un ampio numero di variabili: temperatura ambientale, umidità relativa, ricambio aereo e velocità dell'aria, granulometria e tipo di pulviscolo, stato dei pavimenti, delle pareti e dei soffitti, materiali utilizzati per le superfici di lavoro e per le apparecchiature, lunghezza della linea di lavorazione, tempi di percorrenza, allontanamento dei rifiuti liquidi e solidi, stato sanitario del personale ecc. Risulta pertanto ardua l'interpretazione univoca e definitiva di tali dati, comunque ottenuti.

Essi rivestono tuttavia un carattere indicativo al fine di premunirsi contro eventuali insuccessi igienico-tecnologici i quali, quando si verificano, vanno valutati caso per caso.

Esistono alcune misure igieniche che, se attuate in maniera corretta, non possono che portare ad un miglioramento della situazione generale.

Fra esse andrebbero annoverate l'impiego di idonei impianti di condizionamento dell'aria provvisti di filtri depuratori, il trattamento delle pareti dei locali con pitture contenenti sostanze atossiche antibatteriche e antifungine a lunga persistenza, il tempestivo allontanamento dei rifiuti liquidi e solidi, il ricorso a periodiche operazioni di sanificazione ambientale a base di aerosol in grado di inibire sia spore batteriche che funghine.

Infine, e con ciò concludo, andrebbe particolarmente curata l'igiene delle toilettes e l'igiene personale degli addetti alla produzione, non trascurando questi ultimi di fare ricorso

so, più volte durante il turno lavorativo, ad un accurato lavaggio delle mani e, quando opportuno, all'uso di copricapo e guanti sterilizzati.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Cannon R.Y. - Microorganism in milk plant air.
J.of milk and food technol.33,19-21,1970.
- 2) Ottaviani F.- Rapporto tra carica micetica nell'aria confinata e qualità di produzione nell'industria alimentare.
Atti del convegno "Il controllo microbiologico dell'aria e dell'igiene ambientale" - S.I.M.A. Milano, 1983.
- 3) Ottogalli G et al - Correlazioni tra contaminazione ambientale e qualità dei prodotti lattiero-caseari.
Atti del convegno "Il controllo microbiologico dell'aria e dell'igiene ambientale " -S.I.M.A. Milano, 1983
- 4) Orefice L.et al. - Considerazione sugli aspetti microbiologici dell'aria di ambienti destinati alla produzione e distribuzione di alcuni alimenti e loro influenza sulla igienicità degli stessi.
Atti del III Congresso Internazionale della N.I.A. -1982 Spoleto
- 5) Carazzone M. Nobilio S. - La contaminazione microbica dell'aria in ambienti per lavorazioni aseptiche.
Atti del Convegno "Norme di igiene nella produzione alimentare, farmaceutica e cosmetica" - S.I.M.A. Milano,1977
- 6) Cantoni C. - Focolai d'inquinamento microbico nella produzione di prodotti cotti di salumeria.
Atti II colloquio italiano d'igiene -Milano, 1974
- 7) Baldock J.D. - Microbiological monitoring of the food plant: methods to assess bacterial contamination on surfaces.
J. of milk and food technol 37,361-368,1974
- 8) Niskanen A; - Pohja M.S. - Comparative studies on the sampling and investigation of microbial contamination of surfaces by the contact plate and swab methods
J. of applied bacteriol.42,53-63,1977.
- 9) Baumgart J.-Kussmann H -Eine spruhmethode zur ermittlung des oberflächenkeim gehaltes bei schlachttieren. Die Fleischwirtschaft 55,1113-1114,1975
- 10) V.D.Hoeven E. - Hinton N.A. - Can Med Assoc.J.99,402;1968
- 11) Noble W.C. - Balkenburg H.A. - J.Hyg. Camb 65,567,1967
- 12) Ojajarvi J.-Makela P. - J.Hyg.Camb 79,107,1977
- 13) Pollack M; - Charache P. -Lancet ii,668,1972

- 14) Pether J.V.S. - Gilbert R.J. - The survival of salmonellas on finger-tips and transfer of the organisms to foods
J.Hyg.Camb 69, 673-861,1971.
- 15) Fleurette J. - Transy M.J. - Essai d'amelioration et de standardisation du prelevement des microorganismes cutanes au moyen d'un appareil electrique.
Rev. Inst.Pasteur de Lyon,11,493-501,1978
- 16) Williamson P.W. - Kligman A.M. - a new method for the quantitative investigation of cutaneous bacteria.
J. invest.Derm. 45,498-503,1965.

LES DESINFECTANTS DANS LA PRODUCTION DES ALIMENTS

Prof. Andrée CREMIEUX

Faculté de Pharmacie - Université D'Aix Marseille II

Tout au long de l'élaboration d'un aliment, et jusque au moment de sa consommation, de nombreuses mesures préventives ou divers traitements sont mis en oeuvre afin d'assurer une qualité hygiénique satisfaisante. Compte tenu du long parcours et de la multitude des interventions que subissent la plupart des denrées alimentaires, plusieurs sortes de spécialistes auraient pu traiter le sujet qui m'a été confié: du vétérinaire chargé par l'Etat de la surveillance sanitaire à l'ingénieur de fabrication d'une industrie, nombreux sont ceux qui ont les compétences indispensables pour assumer leur responsabilité en matière d'hygiène des aliments livrés à la consommation. Je ne suis pas de ceux-là, je suis seulement un microbiologiste, et c'est donc le point de vue du microbiologiste sur ce vaste sujet que je vais m'efforcer de vous présenter.

Pour mieux exposer ce point de vue, je crois utile de commencer par un tour d'horizon qui me permettra de préciser le vocabulaire que j'utilise. Ensuite j'essaierai de

faire une brève synthèse des nombreux aspects de la désinfection dans le secteur agro-alimentaire avant de vous soumettre les réflexions auxquelles divers résultats de laboratoires relatifs aux désinfectants m'ont conduite. Et j'espère alors que tous ensemble nous pourrons tirer quelques conclusions.

Le premier rappel que je souhaite faire concerne les différents stades de la production des aliments qui sont résumés sur le schéma 1, qui me permet de préciser les notions de contamination "primaire" et "secondaire" des aliments.

Par contamination "primaire" (cf. Tableau 1) on entend la contamination microbienne (essentiellement bactérienne, quelquefois virale) directement liée à l'état sanitaire de la denrée produite. Il s'agit essentiellement de microorganismes pathogènes ou potentiellement pathogènes pour l'animal, parfois de microorganismes n'engendrant pas une affection apparente. De nombreux exemples peuvent être cités. La surveillance sanitaire des élevages est un élément déterminant du niveau de contamination primaire. C'est ainsi que le dépistage des animaux tubercu-

leux et leur abattage systématique a fait disparaître Myco
bacterium bovis du cheptel bovin au point qu'actuellement
en France, les quelques animaux qui sont actuellement dé-
pistés sont infectés par M. tuberculosis et ont donc con-
tracté leur tuberculose auprès de l'homme!

Il est beaucoup plus difficile de cerner les contami-
nations secondaires: on regroupe en effet sous ce vocable
toutes les contaminations que subit l'aliment au cours de
son cheminement vers le consommateur: à tous les stades de
transformation des apports microbiens multiples, abondants
et variés peuvent survenir. Le devenir de cette flore aj-
outée, sa simple persistance, ou sa multiplication inten-
se, ou parfois sa disparition sera liée à la denrée alimen-
taire elle-même et aux conditions physico-chimiques dans
lesquelles elle sera maintenue. En effet, les facteurs
qui jouent sur l'évolution de la flore sont multiples et
leur incidence sur la multiplication ou l'inhibition de la
multiplication de chaque microorganismes sont difficiles à
appréhender globalement. Quelque uns d'entre eux sont
rappelés dans le tableau n. 2.

La résultante de ces différentes tendances conduit gé

néralement à l'envahissement de la denrée par une espèce microbienne, quelquefois on assiste à l'invasion successive par deux ou trois espèces, chacune d'elle créant un "milieu" nouveau favorable à la suivante. Ce n'est que rarement que l'on assiste à la disparition des microorganismes présents, c'est-à-dire à l'autostérilisation du produit.

Bien entendu, l'homme s'est efforcé d'intervenir sur ces phénomènes afin de modifier l'évolution de cette flore et plusieurs procédés peuvent être appliqués simultanément ou successivement pour réduire et même supprimer la flore, par exemple:

- les procédés qui réduisent la teneur en eau libre (dessiccation, confisage, confitage, lyophilisation, congélation)
- les traitements thermiques (pasteurisation, appertisation, stérilisation)
- l'ajout de conservateurs.

Bien évidemment aussi, tout doit être mis en oeuvre pour limiter les contaminations secondaires, en nombre et

en intensité. Et c'est ainsi que les désinfectants vont contribuer à améliorer la qualité des denrées alimentaires. En principe, les procédés de désinfection s'appliquent exclusivement au matériel inerte. La "désinfection des mains" doit donc être placée dans le cadre de l'antisepsie puisqu'elle concerne des tissus vivants. Malgré l'importance du lavage des mains par des méthodes et au moyen de produits d'efficacité très variable, je n'aborderai pas ici le sujet. De même que je n'envisagerai pas les autres aspects de l'antisepsie tels que la désinfection des trayons avant la traite.

Quand et pourquoi, comment se pratiquent les désinfections? Quelles sont leur potentialités et leurs limites?

La désinfection se situe à tous les niveaux de la production des aliments.

Appliqués aux locaux, aux parcs et aux cages et d'une façon générale à tous les équipements intervenant dans les élevages, la désinfection permet de réduire les taux de morbidité et de mortalité des animaux. C'est un des éléments de la réduction des contaminations primaires des ali

ments. Ces procédés de désinfection font l'objet le plus souvent d'une législation et d'une réglementation précises.

A toutes les étapes de la transformation et de la distribution, on procède à des désinfections, dans le but de limiter les apports microbiens par contact entre une source de microorganismes et la denrée considérée. Le succès de ces opérations va dépendre;

- de la localisation des microorganismes: certaines sources sont facilement accessibles (surfaces de travail) d'autres sont difficilement accessibles (tuyauteries, fissures, etc...)

- de la nature des microorganismes à détruire: selon que la contamination est bactérienne ou fongique, ou que l'on a affaire à une pollution spécifique, on choisira le désinfectant et la procédure d'application la plus appropriée.

- de l'efficacité du désinfectant. Tout le monde s'accorde à reconnaître qu'un désinfectant doit être capa-

ble de tuer les microorganismes indésirables et pas seulement de les inhiber.

Nous verrons tout à l'heure que l'efficacité d'un désinfectant dépend aussi de certains facteurs: température, état de dispersion des microorganismes et présence d'inhibiteur (substances interférentes).

On doit savoir qu'il n'y a aucun procédé standard de désinfection, et que le désinfectant le plus efficace, s'il est mal utilisé, pourra être sans activité.

On peut cependant regrouper les procédés qui présentent des traits communs, par exemple;

- Pour le traitement des surfaces (plans de travail et sols) un choix devra être fait entre:

. la méthode séquentielle: nettoyage avec des détergents appropriés, puis désinfection de la surface propre.

. la méthode simultanée: nettoyage et désinfection sont assurés par l'usage d'un produit unique (détergent-désinfectant).

Si, à priori, la première méthode paraît plus sûre, il ne faut pas oublier que le choix du détergent et du désinfectant ne doit pas être fait indépendamment. Les incompatibilités entre détergents anioniques et désinfectants à base d'ammoniums quaternaires sont connues depuis longtemps, mais elles ne sont pas uniques et les résidus de tensio-actifs non ioniques et amphotères peuvent inactiver l'activité des désinfectants à base d'ammoniums quaternaires ou de glutaraldéhyde ou de P.V.P. iodée.

- La désinfection d'appareils et de machines intervenant dans les fabrications est souvent difficile. Lorsque le démontage des pièces en contact avec l'aliment est possible, on peut considérer que le problème est identique au cas précédent.

Mais très souvent, certaines pièces sont inaccessibles, au moins quotidiennement. On fait alors appel de préférence à des traitements thermiques (stérilisation par la vapeur si possible). Et les désinfectants n'interviennent que secondairement: par exemple, en cas de production discontinue, on remplit la chaîne de fabrication avec une solution de désinfectant qui n'est éliminée qu'au moment

de la reprise de fabrication. Si le traitement thermique n'est pas envisageable, et si seule la "stérilisation chimique" est applicable, l'usage successif de plusieurs désinfectants précédés d'un nettoyage approfondi avec des détergents ou même de la soude sont préconisés.

- La désinfection de l'air est souvent citée. En réalité il s'agit d'un procédé de désinfection des surfaces dans lequel le désinfectant est diffusé par voie aérienne. Cette diffusion permet d'atteindre toutes les surfaces (y compris murs et plafonds) et surtout toutes les anfractuosités du local traité.

Plusieurs variantes sont applicables à des situations très diverses: elles font appel à des équipements importants (brumisateurs capables de traiter d'énormes volumes) ou simples sprays à appliquer régulièrement sur les surfaces de containers ou sur les parois de véhicules.

Il est établi que l'air n'est qu'un fluide dans lequel peuvent transiter des microorganismes portés par des vecteurs (poussières) et que sa désinfection n'a pas de sens. Mais la diffusion par voie aérienne de produits

antimicrobiens est tout à fait justifiée: c'est le seul no
yen d'atteindre commodément et fréquemment des réservoirs
de microorganismes d'accès difficile.

Il ne m'est pas possible de traiter ici l'aspect rè-
glementaire de la question. Cependant, vous devez savoir
que pour limiter les risques toxiques dus à la présence de
résidus de désinfectants dans les denrées alimentaires,
chaque pays a mis en place une législation très stricte
(qui est parfois différente d'un pays à l'autre). Cer-
tains désinfectants sont interdits ou leur usage est limi-
té. Parfois un rinçage soigneux peut être imposé. Cha-
que catégorie de denrées alimentaires est soumise à une ré-
glementation définie et le niveau de leur qualité microbio-
logique est fixé en fonction de la nature de l'aliment et
du risque microbiologique pour l'homme. Les contrôles sy-
stématiques effectués en bout de chaîne (point de vente au
consommateur) ont été, au moins en France, un des facteurs
déterminants de l'amélioration de la qualité hygiénique
des aliments et ils ont entraîné des contrôles de qualité
à des niveaux intermédiaires c'est-à-dire à la production
et en cours de fabrication.

La pratique de la désinfection nécessite bien sûr l'usage de désinfectants. Il s'agit de préparations commerciales simples (ex: hypochlorite de sodium) ou très complexes (formules associant plusieurs principes actifs à des détergents, des parfums parfois, etc...). Un très grand nombre de produits sont à la disposition des utilisateurs sur le marché, et l'une des plus grandes difficultés est de faire parmi eux un choix judicieux.

Quelles sont les aptitudes attendues d'un désinfectant?

Essentiellement on demande qu'il soit bactéricide et/ou fongicide, car la majeure partie des contaminants correspond à des bactéries et/ou à des levures et moisissures. Ces propriétés peuvent être facilement vérifiées en laboratoire, et plusieurs méthodes sont appliquées dans certains pays: elles diffèrent par le nombre et la nature des souches-test, le taux de réduction exigé, la rigueur du test et sa reproductibilité. Je me-permets d'insister sur la nécessité de déterminer un taux de réduction et sur le danger de faire appel à des méthodes en tout ou rien (cf. Schéma n.2). On peut aussi apprécier l'efficacité

du désinfectant "in situ" en déterminant la flore résiduelle après traitement. Toutes ces méthodes sont bien connues (ainsi que leurs limites) et il ne faut pas en négliger la valeur. Je pense cependant qu'elles ne sont pas toujours suffisantes pour informer l'utilisateur sur l'efficacité du désinfectant dans les conditions qui sont propres à son usine ou son atelier.

Pour vous convaincre, je vous présente quelques résultats obtenus dans mon laboratoire avec cinq désinfectants. Les méthodes utilisées pour déterminer les CMB sont les méthodes AFNOR, et nous avons pratiqué à la fois l'essai de référence en eau distillée (NF T 72-150 et 151) et quatre essais en présence de substances interférentes; protéines, eau dure, tampon acide, tampon alcalin (NF T 72-170 et 171). Les résultats pour les cinq souches-test sont représentés sur les histogrammes 1 à 5. Trois observations se dégagent:

- On ne peut jamais déduire la concentration bactéricide d'un désinfectant dans un milieu donné (ex: en présence de protéines) simplement en appliquant un coefficient multiplicateur à la CMB en eau distillée. Seule une expérimentation rigoureuse, sur plusieurs souches et en

présence des substances pouvant interférer sur l'activité permet de proposer valablement des concentrations d'utilisation.

- Si l'on connaissait pour chaque souche-test la CMB en présence des substances interférentes les plus fréquentes, on pourrait peut être pratiquer des désinfections spécifiques dirigées contre tel ou tel type de microorganisme; cette pratique serait d'un moindre coût et diminuerait le taux de résidus chimiques dans les aliments.

- Puisque certaines espèces bactériennes sont capables de résister à de très fortes concentrations de désinfectants lorsque une substance interférente définie est présente, on peut comprendre comment l'usage d'un désinfectant peut faciliter l'invasion d'un local ou d'un appareil par une espèce microbienne donnée.

Si je me permets d'insister sur ces résultats de laboratoire, c'est justement parce qu'ils peuvent permettre d'expliquer divers échecs de la désinfection; or tout échec qui peut être prévu peut être évité. L'utilisateur doit donc posséder des informations complètes sur les po-

tentialités du désinfectant qu'il se propose d'appliquer. Mais actuellement cela est rarement le cas. Il sera peut être possible dans l'avenir, de prévoir de tels phénomènes et de les relier à la nature chimique du désinfectant. Dans un autre travail, nous avons pu montrer que les interférences par les protéines et l'eau dure étaient très marquées pour les produits à base d'aldéhydes et d'ammoniums quaternaires et beaucoup moins pour les produits phénoliques.

J'espère que cette incursion au laboratoire vous aura convaincus de l'intérêt de certains essais qui sont bien sûr, très loin de la pratique quotidienne, mais qui permettent de mettre en évidence des phénomènes très importants pour les applications pratiques. Je voudrais surtout, et c'est sur ce point que je concluerai, vous dire que je suis certaine que la désinfection a un bel avenir devant elle: généralement facile à mettre en oeuvre, d'un coût modéré, elle doit être l'une des méthodes les plus fiables pour réduire la contamination microbienne; mais elle doit être pratiquée intelligemment en fonction de critères surs et non, seulement avec la foi, celle qui fait espérer des miracles, mais qui est souvent déçue.

NATURE DES MICROORGANISMES ET ORIGINE DES CONTAMINATIONS

Contaminations primaires

- exemples: lait : bacilles tuberculeux
 Brucella
 Leptospira
 viandes : Brucella
 Yersinia
 Salmonella
 Listeria
 Leptospira
 oeufs : Salmonella

Contaminations secondaires

- Flore fécale de l'animal } par contact direct ou par
- Flore fécale humaine } intermédiaire de l'environnement
- Autres bactéries d'origine humaines: ex: Staphylococcus aureus
 (ou animale) Candida
- Microorganismes de l'environnement:
 - Bacilles gram négatif (notamment Pseudomonas)
 - Levures et moisissures
 - Bactéries sporogènes (Bacillus, Clostridium)

FACTEURS INTERVENANT DANS L'EVOLUTION DE LA FLORE DES DENREES ALIMENTAIRES

- 1) - NATURE DES ESPECES MICROBIENNES
- 2) - FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES
 - Nature chimique de l'aliment (teneur en protéines, glucides, lipides)
 - Teneur en eau libre (facteur aw)
 - pH
 - Potentiel redox
 - Température de stockage
- 3) - NATURE DE L'EMBALLAGE
- 4) - PROCÉDES DE CONSERVATION
 - Procédés physiques (chaleur, froid, rayonnements, filtration)
 - Procédés chimiques (sel, sucre, SO₂, nitrites, conservateurs divers)
 - Procédés mixtes

SIGNIFICATO DEL "PORTATORE" NELLA PRODUZIONE DEGLI ALIMENTI.

Dott.ssa Graziella Orefici

Laboratorio di Batteriologia e Micologia medica. - I.S.S.

Il portatore di microrganismi patogeni che svolge il suo lavoro inserito in una comunità di qualsiasi tipo, rappresenta sempre un problema almeno potenziale di Sanità pubblica.

Definire il peso reale di tale problema nella produzione degli alimenti è argomento che merita attenta riflessione perchè da questa valutazione dipendono due decisioni importanti: dobbiamo, a scopo profilattico individuare i portatori di possibili patogeni? E, una volta che li abbiamo trovati, cosa dobbiamo farne?

Se noi consideriamo quali sono i microrganismi più facilmente implicati in caso di tossinfezione alimentare, vediamo che sia pure con qualche differenza in percentuale a seconda del contesto socio-economico dei vari paesi, essi sono essenzialmente rappresentati da Salmonella, S.aureus e Clostridium perfringens. Tuttavia lo spettro delle malattie che possono essere trasmesse attraverso gli alimenti per contaminazione degli stessi è molto più ampio e va dal colera, alla epatite virale, dalla faringite settica al tifo ecc.

Come conseguenza di ciò appare corretto, in caso di focolaio epidemico svolgere una indagine epidemiologica corredata dagli esami microbiologici necessari a livello dei malati, degli impianti, degli alimenti e di coloro che

li hanno manipolati, per accertarne l'origine. Questo è utile non solo per ricostruire la catena degli eventi che hanno condotto alla contaminazione dell'alimento, ma anche di quelli che hanno permesso il moltiplicarsi dei microrganismi nell'alimento contaminato.

Il discorso cambia invece totalmente quando si parli di ricerca sui portatori a scopo preventivo in assenza di un episodio epidemico.

Dal punto di vista concettuale, lo scoprire che un individuo è portatore di un microrganismo che può essere causa di tossinfezione evidenzia un problema ipotetico: non è detto affatto che l'individuo contaminerà l'alimento, nè che il microrganismo avrà modo di moltiplicarsi e dare malattia.

Quanti sono i casi di malattia di origine alimentare o di tossinfezione dovuti ai portatori? Nessuno lo sa con certezza: si può tuttavia dire che i casi in cui è possibile accertare la responsabilità di un portatore sono molto pochi (non oltre il 5%).

In Italia, come in molti altri paesi europei, l'orientamento legislativo è che, all'atto del rilascio o del rinnovo del libretto sanitario, oltre alla visita medica vengano svolte indagini microbiologiche per appurare l'eventuale stato di portatore soprattutto per quanto riguarda gli agenti di malattia a trasmissione oro-fecale (Salmonella, shigella, ecc.) ma in molte regioni, ad esempio il Piemonte, vengono sistematicamente ricercati (un tampone ogni 6 mesi) anche i portatori di S. aureus a livello nasale o faringeo.

Tuttavia non sono mai stati compiuti esperimenti controllati che dimostrino l'utilità di tale misura ed è pertanto difficile attribuire un peso reale nella prevenzione.

Queste indagini però hanno un loro costo reale. In un qualsiasi paese europeo si può calcolare che sia impiegata nel settore alimentare dal 6 al 10% della popolazione.

Anche limitandosi a considerare le indagini più semplici, come la ricerca dei portatori di *Salmonella* e *S. aureus* vengono probabilmente svolti sul territorio nazionale milioni di esami la cui spesa, ai fini della prevenzione di tossinfezione appare difficilmente giustificabile in un'analisi costo-beneficio.

A tale spesa va aggiunta quella dei giorni di lavoro perso in caso di positività, quella del trattamento di bonifica e il danno, difficilmente valutabile, di contribuire, col trattamento antibiotico di individui sani, alla circolazione extraospedaliera di stipti resistenti.

Per di più questa ricerca, oltre a rappresentare una notevole mole di lavoro per le strutture preposte a compierla (laboratori ospedalieri, ex laboratori di Igiene e Profilassi), è molto spesso frammentario. Anche in caso di focolaio epidemico, chi analizza gli alimenti, difficilmente conosce i risultati dell'analisi sui portatori; i pazienti con tossinfezione finiscono (e non sempre) in ospedale.

Come conseguenza di ciò è difficile utilizzare, anche a scopo conoscitivo, i dati raccolti sui portatori.

Ma vi sono anche altre ragioni per diffidare di questo tipo di approccio alla prevenzione delle tossinfezioni alimentari.

Se noi consideriamo S.aureus sappiamo che circa il 30% degli individui è portatore, a livello nasale e il 10% a livello faringeo. Questo praticando un solo tampone per individuo.

Se però, oltre al naso tamponiamo o facciamo lavare in brodo sterile le mani, se preleviamo più tamponi dallo stesso sito o se ripetiamo il tampone nel tempo vediamo che la percentuale dei portatori è destinata ad aumentare fino a raggiungere il 60-70% e in almeno la metà dei ceppi isolati possiamo documentare la produzione di enterotossina.

Di soliti, una volta appurato che un individuo è portatore di S.aureus in particolare se il ceppo è enterotossico si ritiene doveroso trattarlo con antibiotici localmente o se è ancora positivo per via generale.

Ebbene, nella maggior parte dei casi, anche se l'eradicazione sembra inizialmente aver avuto successo, a distanza di qualche tempo è possibile vedere ricomparire uno stafilococco aureo del medesimo fagotipo.

Per quanto riguarda le salmonelle, invece, in uno studio condotto per il CDC da Baine ed altri è stato visto come sia necessario praticare quotidianamente un tampone per almeno 7 giorni consecutivi per poter mettere in evidenza il 95% dei portatori.

Ovviamente poi una persona può non essere portatore il giorno del prelievo e divenirlo 10 giorni dopo.

Per di più ricerche sistematiche vengono svolte solo per alcuni microrganismi, i più facili da evidenziare ma ve ne sono altri che possono essere trasmessi dall'uomo agli alimenti e di nuovo all'uomo (epatite virale, ente-

rite virale, Campylobacter) per i quali non vengono svolte indagini di laboratorio routinarie.

Da quanto detto appare evidente anche l'inutilità di usare metodi complessi o costosi (come per gli stafilococchi la produzione di enterotossine, o la tipizzazione fagica) per effettuare una diagnostica fine sui ceppi isolati dai portatori in assenza di focolai epidemici, riservando invece queste indagini, quando ve ne sia una precisa indicazione, agli alimenti o ai microrganismi isolati da essi.

Ben diverso è il discorso quando si sia in presenza non di un portatore sano ma di un individuo affetto da malattia: disseminatore quasi sempre è un malato.

L'individuo affetto da diarrea, se ad una infezione da salmonella unisce scarse attitudini e conoscenze igieniche diviene con facilità un disseminatore; è sufficiente un raffreddore o una dermatite allergica a trasformare un portatore di stafilococco a livello nasale o delle mani in un disseminatore e uno stato di malessere, di qualsiasi natura, è sufficiente da solo a rendere meno vigile l'attenzione di un individuo.

L'osservazione dei casi di malattia e l'allontanamento temporaneo dal lavoro o lo spostamento dell'individuo infetto in settori non a contatto con gli alimenti sono elementi di fondamentale importanza per prevenire quella quota di contaminazione degli alimenti dovuta all'uomo che li manipola.

L'altro elemento fondamentale è l'educazione sanitaria e la vigilanza sull'osservazione delle norme igieniche da parte degli operatori.

Nei casi in cui è l'uomo a contaminare l'alimento perché la tossinfezione si verifichi è necessario una serie di eventi:

1) il reservoir umano, 2) la contaminazione per insufficiente protezione, 3) la moltiplicazione dei microrganismi per mancanza di refrigerazione, 4) l'ingestione dell'alimento contaminato da parte di un ospite suscettibile.

Abbiamo già visto come sia difficile agire realisticamente sul portatore; i punti 2) e 3) sono invece aggredibili da un lato attraverso una adeguata educazione sanitaria che responsabilizzi l'operatore, dall'altro cercando di far osservare la normativa già esistente per quanto riguarda la protezione degli alimenti.

Del resto il problema di portatori non è nuovo: la trasmissione dal personale è uno degli eventi più importanti nel determinismo dell'infezione ospedaliera. Anche in questo caso, dopo un certo numero di anni in cui si riteneva che un programma di controllo delle infezioni ospedaliere non potesse prescindere da screening di massa sui portatori e dalla ricerca dei microrganismi nell'ambiente, ci si è accorti che era più produttivo usare le risorse a disposizione per impedire la trasmissione migliorando l'educazione sanitaria del personale e il controllo dell'efficacia dei mezzi di sterilizzazione.

Se noi consideriamo le raccomandazioni del C.D.C. e dell'F.D.A. per il controllo delle malattie trasmesse dagli alimenti vediamo che per quanto riguarda la trasmissione del personale, l'accento è posto molto più su semplici misure igieniche (lavaggio delle mani, attenzione ai

casi di malattia) che alla ricerca dei portatori.

Questo atteggiamento è condiviso anche dagli esperti O.M.S. che in un documento di lavoro relativamente recente hanno avanzato numerosi dubbi non solo sull'utilità delle prove microbiologiche svolte sui portatori, ma addirittura su quello delle visite mediche fatte sia al momento dell'assunzione che per il rinnovo del libretto sanitario.

Da quanto detto sopra possiamo concludere che il problema non è cercare i portatori di microrganismi pericolosi tra i lavoratori a contatto con gli alimenti, ma fare in modo che tutti coloro che manipolano cibi si comportino con le stesse attenzioni igieniche che avrebbero se sapessero di essere portatori degli agenti del tifo o del colera.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Control of Foodborn diseases in the food Service Industry-
US Department of Health, Education and Welfare PHS, Center
for Disease Control - Atlanta Georgia 30333
- 2) Foodborne Diseases of contemporary importance - US Depart-
ment of Health, Education and Welfare PHS. CDC training
program - Atlanta Georgia 30333
- 3) Microbiological aspects of food hygiene - Report of a WHO
Expert Committee with the participation of FAO -Technical
Reports Series 598 -WHO Ginevra 1976
- 4) Examens de Santé pour les manipulateurs de produits ali-
mentaires - Rapport sur la reunion d'un group de travail-
Copenhagen 1981 - ICP/FSP 007
- 5) Baine W., Gangarosa E.J., Bennett J.V. et al. Institutional
salmonellosis - J.Infect.Dis. 128:357, 1973
- 6) Gangarosa e.J. Food Services in Hospital Infections p.117-
123 ed.Bennett V., Brachman P.S.- Ediz.Little, Brown and
Company Boston 1979.

CONTROLLO DELLE PARASSITOSI TRASMESSE CON GLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE.

Prof. Adriano Mantovani

Laboratorio di Parassitologia - I.S.S.

Le principali zoonosi parassitarie che in Italia possono essere trasmesse con gli alimenti di origine animale sono:

1. TRASMISSIBILI DIRETTAMENTE ALL'UOMO

- A) Toxoplasmosi
- B) Sarcocistosi
- C) Trichinellosi
- D) Teniasi-cisticercosi
- E) Difillobotriasi

2. TRASMISSIBILI TRAMITE ANIMALI DOMESTICI ALIMENTATI CON CARNE CRUDA

- A) Toxoplasmosi
- B) Sarcocistosi
- C) Echinococcosi-iatidiosi

Vengono qui trascurate quelle parassitosi che (oltre alla toxoplasmosi, alla sarcocistosi ed all'echinococcosi-iatidiosi) possono essere trasmesse tramite verdure contaminate: amebiasi, giardiasi, criptosporiasi, ascariidiosi, ancilostomiasi, trichiuriasi, larva migrante, fascioliasi.

Vengono inoltre trascurate le parassitosi esotiche.

A. TOXOPLASMOSI

E' l'infezione più diffusa sia nell'uomo (alta percentuale di popolazione positiva), sia negli animali (più di 200 specie interessate).

All'uomo, la malattia può essere trasmessa per contatti con gatti infetti, oppure tramite ingestione di carne cruda o poco cotta (importante pure la contaminazione di utensili familiari).

A rischio, in considerazione delle possibili conseguenze, sono soprattutto le donne incinte sierologicamente negative.

Non esistono metodi pratici per evidenziare l'infezione negli animali da macello, per cui le persone a rischio debbono usare le seguenti precauzioni:

- a) evitare l'ingestione di carni crude o poco cotte
- b) evitare la contaminazione di alimenti con mani od utensili che siano stati a contatto con tali carni.
- c) tenere chiuso in appartamento il gatto di casa (se esiste); evitare di somministrargli carne cruda o che vada a caccia di topi, uccelli, ecc., nonché che razzoli nelle spazzature.

B. SARCOCISTOSI

Si tratta di una infezione, dovuta a varie specie di protozoi del genere Sarcocystis, con cicli simili a quelli del Toxoplasma, in quanto i carnivori (cane, gatto, volpe, ecc.) fungono da ospite definitivo, e gli onnivori ed erbivori (suino, bovino, ovino, equino, cervo, ecc.) da ospiti intermedi. L'uomo può fungere sia da ospite definitivo

(sviluppo di parassiti nell'intestino), sia da ospite intermedio (presenza di cisti nei muscoli).

L'infezione è molto diffusa negli animali domestici e selvatici; essa è generalmente asintomatica: sono però descritte anche gravi epidemie, con mortalità ed aborti. Nell'uomo la malattia sembra asintomatica.

L'uomo può infettarsi per ingestione di carni contaminate di animali domestici e selvatici, oppure per ingestione di materiale (ad es. verdure) contaminato con feci di carnivori infetti.

Si tratta comunque di una parassitosi per la quale esistono molte incognite, bisognose di ulteriori ricerche: tassonomia, ciclo vitale, diffusione, patologia.

Per il controllo valgono le stesse misure suggerite per la Toxoplasmosi, tenendo presente la recettività, oltre che del gatto, anche degli altri carnivori.

C. TRICHINELLOSI

In Italia, la classica trichinellosi, dovuta a Trichinella spiralis (ciclo suino infetto-uomo) è scomparsa da tempo, a causa dei mutati sistemi di allevamento e dei programmi di lotta.

E' presente invece Trichinella nelsoni che presenta un ciclo silvestre legato alla volpe. Sono state infatti trovate positive numerose volpi di diverse Regioni italiane, escluse le isole. Il ciclo dell'infezione è poco noto: l'infezione da volpe a volpe avviene soprattutto per cannibalismo; non è chiaro il ruolo di altri animali selvatici, quali ad esempio i piccoli roditori.

In Italia negli ultimi anni i focolai di trichinellosi umana sono stati dovuti ad ingestione di carne di suini tenuti al pascolo in zone frequentate anche da volpi, e ad ingestione di carne di volpe e di cinghiale. Vi è stato inoltre un focolaio (accertato di T.nelsoni) da ingestione di carne di cavallo importato. Vi sono stati anche alcuni casi in persone che avevano ingerito carni di suino infette all'estero.

Il controllo è basato sul controllo (mediante esame trichinoscopico o, meglio, mediante digestione) dalle carni di suini sia importati che nazionali (per i suini di allevamenti industriali si potrà arrivare alla certificazione di "allevamento indenne"), e soprattutto ad un accurato controllo dei suini famigliari (specie se allevati al pascolo) e dei cinghiali. Fondamentale la cottura dei rifiuti alimentari prima della loro somministrazione ai suini. In caso di positività o sospetto le carni possono essere bonificate mediante congelamento.

D. TENIASI-CISTICERCOSI.

La Taenia solium dovuta all'ingestione di carni suine infette con Cysticercus cellulosae è praticamente scomparsa in Italia.

Ogni anno si verificano invece 10-20.000 casi di infezione umana da Taenia saginata dovuta all'ingestione di carni bovine infette con Cysticercus bovis. Le cause di tale alto tasso di infezione vanno ricercate nella capacità di sopravvivenza delle uova di tale tenia nei liquidi delle fogne e dei pozzi neri, che poi vengono utilizzati per l'ir-

rigazione dei pascoli, nonché nell'elevato numero di escursionisti che defecano sui pascoli e nella diffusa abitudine di mangiare carne cruda o poco cotta. Probabilmente anche i bovini di importazione (provenienti soprattutto da Paesi europei con alta incidenza) sono a volte contaminati.

Il controllo delle carni, che viene effettuato al macello, è in grado di evidenziare solo 1/5 dei bovini infetti: in pratica vengono individuati solo gli animali con un più elevato numero di cisticerchi. Sono in studio tecniche sierologiche, che potranno probabilmente essere utilizzate per la certificazione di "allevamenti indenni".

Il controllo è basato soprattutto sulla cottura delle carni (attenzione alla contaminazione degli utensili) e, se si vuole mangiare carne cruda, all'uso di carne congelata. Si deve evitare di defecare in luoghi accessibili ai bovini (e a cervi ed altri ruminanti selvatici).

Le carni contaminate possono essere bonificate mediante congelamento.

E. DIFILLOBOTRIASI

La tenia Diphyllobotrium latum è stata occasionalmente riscontrata anche in Italia, in persone delle zone lacustri, che avevano ingerito carne di pesce cruda o poco cotta.

Il controllo è basato sulla non ingestione di pesce crudo o poco cotto (e sulla sua non somministrazione al cane), sul congelamento del pesce sospetto, e sul controllo della contaminazione di laghi e fiumi con feci umane.

F) ECHINOCOCCOSI-IDATIDOSI

Si tratta di una grave zoonosi che colpisce annualmente oltre 1000 persone, e provoca decine di migliaia di danni al patrimonio zootecnico, soprattutto ovino.

I cani, soprattutto da pastore, randagi e inselvaticati, possono essere portatori di Echinococcus granulosus. Se le uova di tale tenia vengono ingerite da ovini, caprini, suini, bovini, equini, nonché dall'uomo, negli organi di questi (fegato, polmone, ecc.) si formano le cisti idatidee. Se tali cisti vengono ingerite dal cane, il ciclo si completa.

L'uomo può contaminarsi per ingestione di uova: ciò può avvenire in vari modi, tra cui l'ingestione di verdure contaminate da feci di cane infetto.

Il cane di famiglia può infettarsi per ingestione di carni crude contaminate (non sempre il materiale infettante è visibile) per cui bisogna evitare la somministrazione di carne cruda ai cani.

PROBLEMI IGIENICO ALIMENTARI CORRELATI AL V. PARAHAEMOLYTICUS.

Dott.ssa Silvana CIZZARELLI

Laboratorio Alimenti - I.S.S.

Il V. parahaemolyticus è, com'è noto, un microrganismo di identificazione relativamente recente.

Le indagini microbiologiche su tale vibrione ebbero inizio negli anni '50, quando Fujino e coll. (1953) isolarono da pazienti affetti da enterotossicosi acuta un germe che ritennero responsabile della tossicosi stessa e che indicarono come Pasteurella parahaemolytica.

In studi successivi il microrganismo ebbe diverse denominazioni e soltanto nel 1968 Sakazaki, dopo accurate ricerche, propose di classificarlo nel genere *Vibrio*, con due sottogruppi o biotipi: il V. parahaemolyticus, comprendente i ceppi patogeni, ed il V. alginolyticus comprendente i ceppi incapaci di causare gastroenteriti.

Il V. parahaemolyticus è un normale componente saprofito dell'ambiente marino; è presente, infatti, nelle acque costiere e negli estuari, nei sedimenti e nel plancton. Ricerche particolareggiate sulla sua distribuzione stagionale indicano la presenza di un numero relativamente alto di vibrioni durante la stagione estiva (fino a $6,6 \cdot 10^4$ vibrioni/g. di sedimento) (Bartley e Slanetz, 1971 - Balakrish e coll., 1980), contrariamente a sporadiche apparizioni nel corso di quella invernale; probabilmente i vibrioni sopravvivono durante l'inverno in numero molto ridotto nei sedimenti (Kaneko e Colwell, 1973).

Nella tarda primavera i vibrioni si uniscono allo zoo-

plancton moltiplicandosi grazie all'innalzamento della temperatura. Durante l'estate, poi, la popolazione batterica è associata alla superficie dello zooplancton e la sua capacità di digerire la chitina le conferisce un importante ruolo nel processo di mineralizzazione dello zooplancton stesso (Kaneko e Colwell, 1975).

Risulta quindi evidente come tale microrganismo possa entrare a far parte della normale microflora di varie specie marine; è stato, infatti, isolato da mitili, granchi, aragoste, tonni, sardine, maccarelli, ecc. solo per citarne alcuni.

La sua presenza, inoltre, è stata rilevata in varie parti del mondo, dall'Australia (Battey, 1970) all'America del Nord (Ward, 1968 - Thompson e Thacker, 1974), alla Inghilterra (Barrow, e Miller, 1972), alla Francia e alla Spagna (Liston e Barross, 1973), nel bacino del Mediterraneo (Sahn e coll., 1978) e anche in Italia (Gianelli e coll., 1970 - Giammanco e coll. 1973).

Come abbiamo visto quindi, il V. parahaemolyticus può essere presente in basso numero, come contaminante naturale di svariati alimenti di origine marina; pertanto, i Paesi maggiormente esposti a rischio della tossinfezione, sotto questo punto di vista, sono quelli in cui è invalso l'uso di consumare pesci o molluschi crudi. Non sono da sottovalutare, comunque, i casi di ricontaminazione di alimenti già bonificati; questi sono stati infatti la causa principale dei casi di tossinfezione verificatisi negli U.S.A. ed in altri Paesi europei (Liston, 1976).

Caratteristiche della tossinfezione

Il fenomeno tossinfettivo è quasi esclusivamente associato ad alimenti di provenienza marina o all'acqua ed è principalmente ristretto al periodo estivo.

Casi di contagio interumani non si sono mai verificati; Hobbs (1973) suggerisce un ciclo "uomo-acqua-alimento-uomo", che ha inizio con la contaminazione delle acque costiere da parte di liquami inquinati con i vibrioni eliminati dagli ammalati.

Il periodo d'incubazione varia da 6 a 24 ore, raramente 48. La sintomatologia, in genere, si manifesta con dolori epigastrici violenti (82%), accompagnati da nausea (71%), vomito (52%), diarrea (98%). In molti pazienti è possibile rilevare ipertermia (27%). La durata dell'infezione è generalmente di 3 giorni, ma può variare da poche ore a 10 giorni.

Durante la fase acuta dell'infezione, i vibrioni vengono escreti numerosi con le feci, ma il loro numero tende poi a diminuire rapidamente con il regredire dei sintomi.

La dose infettiva per l'uomo è piuttosto massiccia, ed è stata stimata da Sakazaki (1971) dell'ordine di circa 10^6 - 10^9 cellule.

L'enteropatogenicità del vibrione è vista, al momento attuale, come effetto di una rapida moltiplicazione batterica a livello della mucosa intestinale ed appare strettamente correlata all'attività emolitica del microrganismo stesso, che viene messa in evidenza dal test di Kanagawa.

Tale prova consiste nella formazione di zone chiare

di beta-emolisi in piastre allestite con terreno di base (Wagatsuma agar) addizionate di eritrociti umani freschi.

La componente emolitica associata alla reazione di Kanagawa è stata isolata e purificata e risulta essere una proteina termostabile (Twedt, 1980). E' stata dimostrata, inoltre, anche la presenza di una emolisina termolabile.

Occorre, comunque, rilevare che nel corso di epidemie causate da cibi contaminati da V.parahaemolyticus, ceppi Kanagawa positivi vengono isolati molto raramente dagli alimenti, sebbene tutti quelli provenienti dagli ammalati siano Kanagawa positivi. Inoltre, studi condotti in proposito hanno dimostrato che la somministrazione di ceppi Kanagawa negativi all'uomo o agli animali, non ha mai portato alla eliminazione di batteri Kanagawa positivi.

La spiegazione più plausibile sembra essere, così come suggerito da Scheffers, (1979), che in generale solo gli alimenti contaminati con vibrioni Kanagawa positivi possono causare gastroenteriti; tali vibrioni sono difficilmente isolabili a causa della enorme prevalenza negli alimenti di cellule Kanagawa negative, ma possono diventare predominanti nell'intestino per un processo di selezione non ancora conosciuto. E' stato visto, infatti, che i ceppi Kanagawa positivi possiedono una maggiore capacità adesiva alle pareti intestinali delle vittime.

E' stato anche ipotizzato da Barross (1978) che nel loro habitat naturale i vibrioni possono trasferirsi l'un l'altro il fattore di virulenza mediante scambi genetici.

L'enteropatogenicità del vibrione, oltre che dalla reazione di Kanagawa può essere messa in evidenza anche

con il test sull'ansa intestinale di coniglio (ileal loop test).

Tale tecnica consiste nell'inoculare in vivo, su una ansa isolata il vibrione in esame e successivamente nel misurare l'accumulo di fluido e la dilatazione del segmento intestinale ove è stato praticato l'inoculo.

Studi eseguiti impiegando questa tecnica hanno messo in evidenza che non tutti i ceppi Kanagawa positivi forniscono un responso patologico, mentre qualche ceppo Kanagawa negativo lo produce.

Il V. parahaemolyticus elabora anche endotossine simili a quelle prodotte dalle altre enterobatteriacene, il cui ruolo nella patogenesi di tale vibrione non è stato ancora dimostrato, ma che probabilmente agiscono con un meccanismo analogo.

Morfologia e caratteristiche biochimiche

La morfologia del V. parahaemolyticus, com'è noto, può variare considerevolmente a seconda delle condizioni colturali impiegate.

Generalmente si presenta sotto forma bastoncellare di piccole dimensioni, Gram negativo, a disposizione singola a volte incurvato a virgola, asporigeno. E' anaerobio facoltativo e mobile per ciglia polari. In terreni agarizzati le colonie si presentano piuttosto grandi (2-4 mm), lisce, opache con centro leggermente incurvato.

Il V. parahaemolyticus è mediamente alofilo, con un optimum di crescita a concentrazioni del 2-4%. Non cresce nei normali terreni privi di sale e tollera una concentra-

zione massima di quest'ultimo dell'8%.

Il pH ottimale per la crescita è leggermente alcalino: 7,8-8,6; sono stati tuttavia, riportati anche valori di pH molto bassi, quali 4,8 e molto alti, circa 11,0 (Beuchat, 1973).

Il valore minimo di "water activity" per la crescita è di 0,937 (Beuchat, 1974); mentre la temperatura ottimale si aggira intorno a 35°-37°C, sebbene una buona crescita venga osservata dai 15°C ai 43°C. Il V.parahaemolyticus è estremamente sensibile alle temperature di refrigerazione, più che a quelle di congelamento; la minore o maggiore sopravvivenza del germe dipende, comunque, dal substrato in cui viene mantenuto e soprattutto dalla concentrazione di sale e dal pH di questo.

Fermenta diversi zuccheri, tra cui glucosio (senza produzione di gas) e mannite; non attacca invece il lattosio.

Inoltre, è positivo per catalasi, ossidasi, indolo, riduzione dei nitrati, rosso metile; è negativo per ureasi e produzione di H₂S.

Ancora, tale vibrione ha la capacità di idrolizzare l'amido e la chitina; tale caratteristica, come abbiamo già detto, presenta aspetti vantaggiosi, dal punto di vista ecologico, nell'ambiente marino.

Il V.parahaemolyticus può essere ucciso mediante riscaldamento a 60°C per 15'. Tuttavia, a seconda del substrato alimentare, può sopravvivere a temperature intorno agli 80°C (Vanderzant, 1972). La bollitura a 100°C sembra, comunque, un adeguato trattamento termico per la bonifica

di alimenti contaminati.

Caratteristiche sierologiche

Il V.parahaemolyticus possiede tre gruppi di determinanti antigenici: antigeni somatici (O), antigeni capsulari (K) ed antigeni ciliari (H).

Twedt (1969) e Sakazaki (1972) hanno proposto uno schema basato sulla identificazione di 12 antigeni somatici e 52 antigeni capsulari. In tale classificazione non furono presi in considerazione gli antigeni H, in quanto questi erano risultati sierologicamente identici in tutti i ceppi saggiati. Tale schema è basato unicamente su ceppi isolati da materiale umano.

Dagli alimenti e, talvolta dagli ammalati, vengono isolati più di un sierotipo di V.parahaemolyticus dallo stesso campione; comunque, allo stato attuale, i tests sierologici non rivestono valore diagnostico, in quanto molti altri microrganismi marini possono agglutinare con gli antisieri O e K del vibrione parahaemolitico.

Del tutto recentemente, però, alcuni autori giapponesi (Shinoda e coll., 1983) hanno messo a punto un metodo sierologico per l'identificazione del V.parahaemolyticus da reperti ambientali, basato sulla agglutinazione con sieri specifici per i differenti determinanti antigenici dei flagelli (HL1, HL2, HL3). Tale metodo è comunque ancora in fase sperimentale.

Ricerca del V.parahaemolyticus negli alimenti

Come abbiamo già detto, la mappa relativa ai reperti

di V.parahaemolyticus si va facendo sempre più estesa, ciò ha accresciuto l'interesse per la messa a punto di metodiche più idonee per il rilevamento di tale vibrione sia nell'ambiente che in alimenti ittici.

Occorre, inoltre, rilevare che la scarsa competitività del V.parahaemolyticus all'antagonismo esercitato dalla flora microbica accessoria, l'estrema sensibilità di tale vibrione ai fattori fisici e chimici (temperatura e pH) e la sua eventuale bassa concentrazione nel substrato, costituiscono tutti elementi che determinano la necessità di ricorrere ad una fase preliminare di arricchimento.

Il metodo maggiormente seguito per la determinazione di questo microrganismo negli alimenti è quello consigliato dalla Food and Drug Administration (Wentz e Fishbein, 1973); tale metodica consiste nell'omogeneizzare g 50 dell'alimento in esame in ml 450 di acqua peptonata al 3% di NaCl (pH 7); si effettuano, quindi, diluizioni scalari dell'omogeneizzato fino a 10^{-4} , che vengono inoculate ciascuna in tre provette di G.S.T.B. (Brodo-Glucosio-Sale-Tepol) secondo la tecnica dell'M.P.N.; dopo 24 h di incubazione a 32°C dalle provette risultate positive (intorbidamento) si eseguono strisci su piastre di T.C.B.S. (Tiosolfato-Citrato-Bile-Saccarosio) terreno solido selettivo proposto da Sakazaki, che vengono poste ad incubare a 32°C.

Su tale terreno le colonie di V.parahaemolyticus appaiono rotonde, di colore verde-blù, in contrasto con quelle di V.alginolyticus e di V.cholerae che appaiono gialle a causa del viraggio acido dovuto alla fermentazione del saccarosio. Occorre esaminare le piastre già dopo 15 h di

incubazione per evitare che le colonie di V.alginolyticus virino al blu-verde in conseguenza di una progressiva attività alcalina (NH_3 dal peptone e dall'estratto di lievito, NaOH dal Na-citrato).

Le colonie di *Pseudomonas* su T.C.B.S. sono, invece, piccole, verde pallido o incolore; mentre i coliformi e gli enterococchi formano colonie piccole e traslucide.

Le colonie sospette per V.parahaemolyticus vengono trapiantate su TSI e Trypticase soy, brodo e agar. In TSI il V.parahaemolyticus fa virare al giallo (acidificazione) la porzione cilindrica della provetta, senza produzione di H_2S o gas.

In seguito vengono eseguite, oltre alla colorazione di Gram, le prove di motilità, di alotolleranza e le prove biochimiche e sierologiche per l'identificazione. Qui di seguito vengono riportate le più utili ai fini di una rapida differenziazione dai contaminanti più simili per caratteristiche morfologiche ecc.

Crescita in presenza dell'0% di NaCl - Indolo +

Crescita in presenza dell'8% di NaCl + Rosso Metile +

Crescita in presenza del 10% di NaCl - Voges Proskauer -

Decarbossilazione lisina + Crescita a 5°C -

Decarbossilazione arginina - Crescita a 42°C +

Decarbossilazione ornitina + Idrolisi amido +

Utilizzazione saccarosio - Utilizzazione citrato -

Utilizzazione mannitolo + Formazione di H_2S -

Il V.parahaemolyticus si differenzia dal V.cholerae per la sua alofilia (*V.cholerae* cresce anche allo 0% di NaCl). Il V.anguillarum, microrganismo patogeno per i pesci, può cre-

scere a 5°C ma non a 42°C.

Il V.parahaemolyticus può essere differenziato dal V. alginolyticus secondo il seguente schema:

	<u>V.parahem.</u>	<u>V.algin.</u>
Crescita in presenza del 10% di NaCl	-	+
Voges Proskauer	-	+
Rosso metile	+	-
Utilizzazione del Saccarosio	-	+

Come abbiamo già detto, è essenziale che tutti i terreni di coltura per il V.parahaemolyticus contengano il 2-3% di NaCl, infatti i vibrioni alofili muoiono rapidamente se sospesi in acqua distillata.

Nell'ultimo decennio sono stati proposti numerosi terreni di arricchimento da impiegare in alternativa al G.S.T.B quali ad esempio il "brodo di carne con il 7% di NaCl" (Kampelmacher e Mossel, 1972). Tali terreni sembrano però di valore limitato (Vanderzant e Nickelson, 1972).

Nel quadro di tale problematica, anche presso i nostri laboratori, è stato messo a punto un terreno semisintetico di arricchimento, di composizione analoga a quella di un omogeneizzato di mitili, nell'intento di riprodurre talune condizioni ecologiche nelle quali vivono naturalmente i vibrioni alofili (De Felip, Toti, Stacchini, Ravagnan, 1974).

L'uso pratico di questo terreno, denominato F.P.S. (Fitone-Peptone-Sulfisoxazolo), ne ha dimostrato le buone caratteristiche di elettività, ma nello stesso tempo, ne ha messo in rilievo la scarsa azione inibente nei confron-

ti della ricca flora microbica accessoria dei prodotti ittici in genere, per cui si è verificata la necessità di migliorarne l'azione selettiva.

A tale scopo abbiamo pensato di impiegare sia un agente maggiormente selettivo, quale un antibiotico a largo spettro, sia di sfruttare l'azione limitativa, sullo sviluppo di molte specie batteriche, di elevate concentrazioni del NaCl.

I risultati delle prove da noi condotte hanno evidenziato che concentrazioni di NaCl del 6% nel substrato di crescita inibiscono in maniera significativa organismi appartenenti ai generi *micrococcus*, *pseudomonas* e *proteus*; mentre tale concentrazione, pur non essendo l'optimum di crescita per il *V.parahaemolyticus*, non è in grado di danneggiarlo.

Per quanto concerne la scelta dell'agente selettivo, sono state saggiate varie sostanze antimicrobiche, a varie concentrazioni, scelte in base alla loro concentrazione minima inibente verso microrganismi vari. Le prove sono state effettuate utilizzando come base comune il terreno con fitone, peptone ed il 6% di NaCl.

Tra i vari antibiotici saggiati, tra i quali eritromicina, cloxacillina, fluocloxacillina, ampicillina e carbenicillina, quest'ultima ha dato i risultati più soddisfacenti. Infatti, alla concentrazione di 1mcg/ml, ha dimostrato una netta azione inibente verso *Proteus*, *Staphylococcus* ed *E.coli*, sia in colture pure che in colture miste dei tre germi, mentre è risultata praticamente priva di attività nei confronti del *V.parahaemolyticus*.

Il terreno nella sua composizione finale, è stato quindi confrontato con lo stesso terreno privo di antibiotici (F.P.), con il terreno da noi precedentemente messo a punto, l'F.L.S. e con altri due substrati attualmente maggiormente impiegati per l'isolamento del V.parahaemolyticus dagli alimenti, il G.S.T.B., come da schema della F.D.A., ed il P.B.S. (Polimixina-Sale-Brodo) secondo Sakazaki (1973).

A tale scopo la crescita di diversi ceppi di V.parahaemolyticus e di altri microrganismi, veniva seguita nei differenti substrati mediante turbidimetria in fase statica (colorimetro) ed in fase continua con l'ausilio di un biofotometro. I risultati sono riportati nella tabella 1.

Tali osservazioni sono state convalidate dall'analisi statistica condotta sui risultati ottenuti.

Sia l'analisi della varianza* (P 0,01) che l'analisi bivalente della varianza per ranghi di Friedman (Siegel, 1956) ($F = 15,08$ con 3 gdl, P 0,01) hanno mostrato l'esistenza di differenze significative sia tra i terreni che tra i ceppi saggiati confermando che il comportamento dell'F.P.C. differisce in modo significativo da quello degli altri terreni; mentre non ci sono particolari indizi che permettano di asserire che quest'ultimi differiscono tra di loro (tabella 2).

Un'ulteriore conferma della validità del terreno è stata accertata, infine, anche mediante prove eseguite in

*L'analisi della varianza è stata eseguita sulle medie dei valori di trasmittanza.

vasche di stabulazione, su campioni di molluschi bivalvi, acqua e sedimenti inquinati sperimentalmente con concentrazioni scarsi di V.parahaemolyticus (da 10^4 germi/ml a 1 germe/ml).

Da tali indagini, condotte in parallelo con l'I.P.C. e il G.S.T.B., si è potuto rilevare che il nostro terreno evidenzia anche 1 cellula/ml di V.parahaemolyticus, mentre il G.S.T.B. ha fornito risultati positivi soltanto per concentrazioni di circa 10 cellule/ml.

o o o o o o o o

Dopo questa breve panoramica, ricordiamo per concludere che il V.parahaemolyticus, anche se può essere presente negli alimenti di origine marina, come contaminante naturale, è fortunatamente un microrganismo molto sensibile al calore, alla refrigerazione, all'essiccamento, all'acidità. I normali processi di preparazione o conservazione sembrano, quindi, sufficientemente cautelativi.

Rimane, comunque, il problema della ricontaminazione di alimenti già bonificati, che come abbiamo già detto è la causa principale degli episodi tossinfettivi verificatisi negli U.S.A. ed in Europa. Per cui, ancora una volta, si ribadisce il concetto della particolare cura che deve essere posta nell'osservanza delle norme igieniche, e dell'importanza di una educazione sanitaria per il personale delle industrie alimentari.

Terreni di arricchimento per l'isolamento del V.parahaemolyticus.

- F.P.S. (Fitone, Peptone, Sulfisoxazolo)

Estratto di lievito	g	3
Peptone	g	10
Cloruro di sodio	g	30
Fitone	g	5
Sulfisoxazolo "Sigma"	g	0,05
Acqua distillata	q.b. a ml	1000

Sterilizzare a 120°C per 20'; pH finale 7,5

- F.P.C. (Fitone, Peptone, Carbenicillina)

Estratto di lievito	g	3
Peptone	g	10
Cloruro di sodio	g	60
Fitone	g	5
Acqua distillata	q.b. a ml	1000

Sterilizzare a 120°C per 20'; pH finale 7,5

Al terreno pronto per l'uso aggiungere carbenicillina in quantità pari a g 0,001/ml 1000.

TABELLA N.1

Sviluppo microbico nei diversi terreni di coltura saggiati.

Valori medi delle letture espresse in % di trasmittanza eseguite al turbidimetro ad una lunghezza d'onda di 525 nm.

CEPPI	TERRENI	F.P.C.	G.S.T.B.	F.S.B.	F.P.S.
<u>V. parahaemolyticus</u> K ⁺⁺		30	18	42	35
<u>V. parahaemolyticus</u> K ⁺		50	19	32	37
<u>V. parahaemolyticus</u> K ⁺		47	21	30	33
<u>V. alginolyticus</u>		24	15	43	25
<u>V. cholerae</u>		85	37	44	50
<u>Pr. mirabilis</u>		100	11	31	35
<u>Ps. fluorescens</u>		100	100	100	100
<u>M. varians</u>		100	30	45	51
<u>St. aureus</u>		98	95	35	97
<u>E. coli</u>		80	12	40	55
<u>S. typhimurium</u>		81	12	40	40
<u>Str. faecalis</u>		70	100	48	40

TABELLA N.2

Tavola dei rarghi

TERRENI CEPFI	F.P.C.	G.S.T.B.	P.S.B.	F.P.S.
<u>V. parahaemolyticus</u> K ⁻	2	1	4	3
<u>V. parahaemolyticus</u> K ⁺	4	1	2	3
<u>V. parahaemolyticus</u> K ⁺	4	1	2	3
<u>V. alginolyticus</u>	2	1	4	3
<u>V. cholerae</u>	4	1	2	3
<u>Pr. mirabilis</u>	4	1	2	3
<u>Ps. fluorescens</u>	2,5	2,5	2,5	2,5
<u>M. varians</u>	4	1	2	3
<u>St. aureus</u>	4	2	1	3
<u>E. coli</u>	4	1	2	3
<u>S. typhimurium</u>	4	1	2,5	2,5
<u>Str. faecalis</u>	3	4	2	1

BIBLIOGRAFIA

- 1) BALAKRISHN MAIR G., MARTIN ABRAHAM and NATARAYAN R.:
"Distribution of V.parahaemolyticus in finfish harvested from Porto Novo (S.India): a seasonal study". Canadian J. Microbiol. 1980, 26, 1964.
- 2) BARROSS J.A., LISTON J. and MORITA R.Y.: "Incidence of V.parahaemolyticus bacteriophages and other Vibrio bacteriophages in marine samples". Appl. Environm. Microbiol. 1978, 36, 492.
- 3) BARROSS J.A. and coll.: "Ecological relationship between V.parahaemolyticus and agar digesting vibrios as evidenced by bacteriophages susceptibility patterns". Appl. Environm. Microbiol. 1978, 36, 500.
- 4) BARROW G.J. and MILLER D.C.: "V.parahaemolyticus a potential pathogen from marine sources in Britain". Lancet 1972, 1, 485.
- 5) BARTLEY C.H. and SLANETZ L.W.: "Occurrence of V.parahaemolyticus in estuarine waters and oyster of New Hampshire". Appl. Microbiol. 1971, 21, 965.
- 6) BATTEY Y.M.: "Gastroenteritis in Australia caused by a marine vibrio". Med. J. Austr. 1970, 1, 430.
- 7) BEUCHAT L.R.: "Interacting effects of pH, temperature and salt concentration on growth and survival of V.parahaemolyticus". Appl. Microbiol. 1973, 25, 844.
- 8) BEUCHAT L.R.: "Combined effects of water activity, solute and temperature on the growth of V.parahaemolyticus". Appl. Microbiol. 1974, 27, 1075

- 9) DE FELIP G., TOTI L., STACCHINI A., RAVAGNAN P.: "Messa a punto di un terreno di arricchimento per il V. parahaemolyticus ed il V. alginolyticus. *Annali Sclavo* 1974, 16, 641.
- 10) FUJINO T., OKUNO Y., NAKADA D., AOYAMA A., FUKAI W., MUKAI T., UEHO T.: "On the bacteriological examination of shirasu food poisoning". *Med. J. Osaka Univ.* 1953, 4, 229.
- 11) GIAMMANCO G., BENINATI S., GIAMMANCO A. e BRANCATO P.: "Isolamento di vibroni alofili riferibili a V. parahaemolyticus da pesci e da campioni di acqua del Mediterraneo". *Boll. Ist. Sieroterapico Milanese* 1973, 52, 1.
- 12) GIANELLI F., CABASSI E., ALLODI C., FRESCHI E.: "Isolamento di batteri correlati a V. parahaemolyticus dalle acque del Mare Adriatico". *Igiene Moderna* 1970, 68.
- 13) HOBBS B.C.: "Food poisoning in England and Wales". *The microbiological safety of food.* - Hobbs J. & H.B. Cristian (eds) 1973, 129-142.
- 14) KAMPELMACHER E.H. and MOSSEL D.A.A.: "A survey of the occurrence of V. parahaemolyticus on mussels and oyster and in estuarine waters in the Netherlands". *J. Appl. Bact.* 1972, 35, 431.
- 15) KANEKO T., COLWELL R.R.: "Adsorption of V. parahaemolyticus onto chitin and copepods". *Appl. Microbiol.* 1975, 29, 269.
- 16) KANEKO T., COLWELL R.R.: "Ecology of V. parahaemolyticus in Chesapeake Bay". *J. Bact.* 1973, 113, 24.
- 17) LISTON J., BARROSS J.: "Distribution of V. parahaemolyticus in the natural environm". *J. Food Tech.* 1973, 36.

- 18) LISTON J.: "V.parahaemolyticus - Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects (M.P. de Fijureido and D.F. Splittstoessen, eds) A.V.I. Westport, Connecticut, 1976.
- 19) SAHN M.A., BANNA A.A., and TABEY SUEHATA A.M.: "Occurrence of V.parahaemolyticus in selected marine invertebrate sediment and seawater around Alexandria, Egypt's. Can. J. of Microbiol. 1978, 28, 11.
- 20) SAKAZAKI R.: "Present status of studies on V.parahaemolyticus in Japan". Symposium F.D.A. - Division on Microbiology - Washington D.C., July 30, 1971.
- 21) SAKAZAKI R.: "Recent trends of V.parahaemolyticus as a causative agent of food poisoning.
SAKAZAKI R.: "Control of contamination with V.parahaemolyticus in seafoods and isolation and identification of the Vibrio. The Microbiological Safety of Food"- B.C. Hobbs, J.H.B. Christian (eds) 1973.
- 22) SCHEFFERS W.A.: "V.parahaemolyticus and its role in food-borne gastroenteritis. - Syllabus of lecture on 14 May 1979 in W.H.O. Sixth post-graduate Course in Food Microbiology and Hygiene - Zeist (The Netherlands).
- 23) SIEGEL S.: "Non parametric statistics ". McGraw Hill '56.
- 24) SUMIO SHINODA, NORIKO NAKAHARA, YONKO N NOMIYA, KYIOMI ITOH and HARVAKI KANE; "Serological method for identification of V.parahaemolyticus from marine samples". Appl. and Environm. Microbiol. 1983, 45, 148.
- 25) THOMPSON W.K. and THACKER C.L.: "V.parahaemolyticus in Canadian shellfish". - International Symposium on V. parahaemolyticus. 1974, 105. Tokyo.

- 26) TOTI L., CROCI L., DE FELIP G., VOLTERRA L., TAGGI F.: "Selective medium for isolation of V.parahaemolyticus". Documento W.H.O. ZO ON/83.161.
- 27) TWEDT R.M., PROCTER L.S., HALL H.E.: "Morphological and serological comparison of Japanese strains of V. parahaemolyticus with related cultures isolated in the United States". J. Bact. 1969, 98, 51.
- 28) TWEDT R.M., PEELER J.T. and SPAULDING P.L.: "Effective ileal loop dose of Kanagawa positive V.parahaemolyticus". Appl. Microbiol. 1980, 40, 1012
- 29) VANDERZANT C., NICKELSON R.: "Survival of V.parahaemolyticus in shrimp tissue under various environmental conditions". Appl. Microbiol. 1972, 23, 34.
- 30) VANDERZANT C. and NICKELSON R.: "Procedure for isolation and enumeration of V.parahaemolyticus". Appl. Microbiol. 1972, 23, 56.
- 31) WARD B.Q.: "Isolation of organism related to V.parahaemolyticus from American estuarine sediments". Appl. Microbiol. 1968, 16, 543.
- 32) WENTZ B. and MISHBEIN M.: "New currents in V.parahaemolyticus". F.D.A. By Lines, 1973, 4, 66.

PROBLEMI IGIENICO-ALIMENTARI EMERGENTI CORRELATI A
YERSINIA ENTEROCOLITICA E VIRUS

Dott. Laura Toti

Laboratorio Alimenti - I.S.S.

Tra i microrganismi capaci di trasmettere gastroenteriti, la Yersinia enterocolitica va assumendo un interesse crescente.

Nel 1966 vennero descritti, nell'uomo, solo 23 casi di infezione dovuti a tale germe; nel 1970 i casi salirono a 642, nel 1972 a più di mille, nel 1974 ad oltre 4000 così come risulta da un recente bollettino dell'OMS. (1,2)

L'incremento della casistica è certamente correlato anche allo sviluppo delle conoscenze su tale germe ed al maggior numero di accertamenti condotti per la sua evidenziazione.

Sotto il profilo microbiologico, ricorderemo che la Yersinia enterocolitica si presenta sotto forma di cellule ovoidi o coccobacillari Gram-negative, mobili a temperatura inferiore a 30°C per flagelli peritrichi, prive di capsula e di spora; tale germe, anaerobio facoltativo, attacca i citrati e l'adonitolo, possiede galattosidasi e catalasi, non produce idrogeno solforato.

I saggi biochimici devono essere condotti tra i 26°C ed i 29°C, temperatura ottimale di crescita.

La Yersinia enterocolitica è un germe psicrofilo che può crescere anche a 4°C; ciò, ovviamente, ha un notevole significato per gli alimenti contaminati e mantenuti in frigorifero; infatti anche un basso numero iniziale è in

grado di proliferare fino a raggiungere i livelli di pericolosità senza alterare i caratteri organolettici dell'alimento stesso. Tale psicrofilia, inoltre, viene utilizzata nei procedimenti analitici per l'isolamento del germe dagli alimenti.

Dal punto di vista immunologico, la Yersinia enterocolitica può essere caratterizzata sulla base di due antigeni di superficie: gli antigeni somatici O e gli antigeni flagellari H (Wauters 1972). Le reazioni sierologiche sono simili a quelle delle salmonelle; gli antigeni O sono lipopolisaccaridi complessi e fanno parte della struttura della endotossina. Ulteriori suddivisioni sierologiche sono basate sulla specificità antigenica degli antigeni flagellari H. Il sierotipo O:3 e O:9 sono i più comuni in Europa, Giappone e Canada mentre il sierotipo O:8 è predominante negli Stati Uniti.

Finora sono stati classificati 34 sierotipi O e 19 sierotipi H.

Dal punto di vista biochimico vengono distinti 5 biotipi di Yersinia enterocolitica (Waters 1970). Ogni biotipo e sierotipo ha un significato specifico per quanto riguarda l'incidenza, la virulenza e la distribuzione nelle varie parti del mondo.

Per quanto concerne l'incidenza della Yersinia enterocolitica negli alimenti, essa è stata ritrovata in vari tipi di carne sia bovina che ovina, che nel pollame, ma la fonte di infezione maggiore per l'uomo sembra essere il maiale. Il sierotipo O:3, che è uno di quelli maggiormente patogeni per l'uomo, è stato isolato dai suini con no-

tevole frequenza (Wauters 1976). Ceppi di Yersinia enterocolitica appartenenti a sierotipi ambientali sono stati isolati da frutti di mare, da vegetali, da acqua e dal latte sia crudo che pastorizzato; tali ceppi ambientali, inoltre, si vanno sempre più diffondendo negli alimenti in genere e nei vegetali in particolare, in relazione al crescente impiego, anche a livello domestico, dei mezzi di refrigerazione.

Lo studio della patogenicità da Yersinia enterocolitica presenta aspetti interessanti ed in continua evoluzione. Va ricordato, innanzitutto, che i ceppi enterotossici di Yersinia producono una tossina termoresistente (ST) quando crescono a 25°C ma non a 35°C; essa dà positivo il test dell'ansa intestinale di topo o di coniglio con un meccanismo di stimolazione dell'adenil-ciclasi simile a quello dell'E.coli enteropatogena. E' stato comunque dimostrato che la produzione di ST da parte della Yersinia enterocolitica non è sufficiente per determinare la virulenza (Shhiemann 1981) infatti è stata messa in evidenza l'esistenza di ceppi attenuati nel tempo, che avevano perso la capacità di indurre la diarrea nel coniglio pur continuando a produrre l'enterotossina (3,4).

Un altro aspetto della patogenicità di tale germe è dato dalla capacità di invadere gli epitelii: comunque, anche il test di laboratorio che si basa sulla capacità di invadere cellule HeLa può essere considerato come uno "screening negativo" cioè i ceppi che non sono invasivi non sono virulenti per l'uomo, mentre un ceppo invasivo non è necessariamente virulento (7).

Più recentemente, è stato messo in evidenza un altro fattore di virulenza correlato con l'invasività (Zink 1980) e cioè un plasmide avente un peso molecolare compreso tra 40 e 48 Mdal. Il DNA di tale plasmide codifica per gli antigeni V e W, che vengono prodotti soltanto a 35°C e solo in presenza di ioni calcio nel terreno di crescita; tale dipendenza non esiste a 26°C in quanto non vengono prodotti gli antigeni V e W (5,6).

La presenza del plasmide sopra indicato può essere messa in evidenza mediante un altro test per l'invasività il Sereny test, basato sull'insorgenza della cherato-congiuntivite nell'occhio di cavia (9).

Nel 1980, oltre la scoperta del plasmide correlato con la virulenza, Laird e Cavanaugh's hanno messo in evidenza che ceppi virulenti di Y.pestis, Y. pseudotuberculosis, e Y. enterocolitica, autoagglutinano sempre nel terreno per le colture di tessuti a 36°C. I ceppi non virulenti non possiedono tale proprietà. Gli stessi autori hanno ipotizzato che la proprietà di autoagglutinare e gli antigeni V e W sono indicatori degli stessi determinanti per la virulenza.(10)

Come si vede da questa rapida disamina, le basi biologiche della patogenicità della Y.enterocolitica sono molteplici e la loro valutazione non è agevole: sotto un profilo igienico-ecologico più ampio, inoltre, la problematica appare ancora più complessa ed ancora non sufficientemente chiarita. Infatti va tenuto presente, tra l'altro che anche i ceppi "ambientali" di Yersinia enterocolitica vanno esercitando una pressione crescente

sull'uomo che, a giudizio di alcuni esperti, è da raffrontare a quella di altri microrganismi patogeni di "sortita" od "opportunisti" quali Klebsiella, Proteus e la stessa Escherichia coli.

Per quanto concerne, infine, il quadro clinico della infezione da Y. enterocolitica, ricorderemo che esso è prevalentemente gastroenterico essendo caratterizzato da febbre, diarrea e/o crampi addominali, che, per la loro sede prevalentemente a livello della fossa iliaca destra, possono simulare una sintomatologia appendicolare. In alcuni casi, ^{infezioni} i pazienti sono stati sottoposti alla asportazione della appendice.

In qualche caso sono state osservate anche infezioni extraenteriche della gola, sangue, tratto urinario, sistema nervoso centrale e ferite.

La terapia, in linea di massima, prevede l'impiego di antibiotici e, in particolare, di streptomina, cloramfenicolo, colistina, kanamicina.

Isolamento della Y. enterocolitica dagli alimenti

La recente letteratura riporta vari metodi per l'isolamento della Y. enterocolitica dagli alimenti. Lo schema seguente rappresenta un mosaico delle metodiche più valide che sono state proposte negli ultimi anni.

Il campione di alimento viene omogeneizzato per 2 minuti in PBS (Phosphate buffered saline sorbitol-bile broth - Feeley 1976).

Aliquote di ml 0,1 dell'omogeneizzato vengono inocu-

late in ml 10 del terreno RMC (Rappaport-verde malachite-carbenicillina - Wauters 1973) o nel brodo selenite modificato (Lee, 1980, Stern 1980). E' utile precisare che lo RMC e il brodo selenite si sono dimostrati efficaci per l'isolamento dei sierotipi più diffusi in Europa e in Canada e cioè 0:3 e 0:9. Tali tipi di arricchimento sono meno efficaci per il sierotipo 0:8 che è tipico degli USA.

Dopo incubazione a 23°C per 3 gg si eseguono gli strisci, sia con che senza pretrattamento con alcali su due o tre tipi di terreni selettivi.

La Y. enterocolitica è tollerante a condizioni di relativa alcalinità, quindi l'uso di un trattamento con KOH risulta selettivo verso organismi suscettibili all'ambiente alcalino (Aulisio 1980).

In letteratura sono descritti vari terreni di isolamento quali il MacConkey addizionato di Tween 80 (MT), l'agar al solfito di bismuto (BS), l'SS agar, il CIM (agar cefsulodina, irgasan, novobiocina - Schiemann 1979). Ultimamente il CIM ha avuto il maggiore successo per lo isolamento della *Yersinia* dagli alimenti.

Le colonie caratteristiche cresciute sui terreni di isolamento vengono passate su TSI a 23°C.

Dopo 24 h di incubazione il TSI deve presentare acidificazione del fondo e del becco, senza formazione di gas né di H_2S . Tali ceppi, inoltre, devono risultare positivi al test dell'ureasi, negativi a quello della fenilalanino-deaminasi ed inoltre mobili a 23°C ma non a 35°C.

Si può, infine, saggiare la potenziale virulenza del ceppo in esame mediante un test di semplice esecuzione

proposto da Laird e Cavanaugh nel 1980: due provette contenenti un terreno per colture cellulari vengono inoculate con il ceppo in esame e poste ad incubare, una a 23°C e l'altra a 35°C. Se, dopo 12 h di incubazione, solo la provetta posta a 35°C mostra autoagglutinazione, si tratta di un ceppo potenzialmente virulento.

o o o o o o o

Presso i nostri laboratori sono in corso una serie di indagini intese a chiarire le condizioni di crescita della Y. enterocolitica che, come già è stato accennato, sono fondamentali per la sua eventuale tossinogenesi.

In particolare, stiamo conducendo prove mirate a studiare lo sviluppo di tale germe quando vengono modificati alcuni parametri culturali.

Le prove, condotte su vari terreni, hanno confermato un optimum di crescita della Yersinia alla temperatura di 26°-28°C e ad un pH intorno a 7-8, anche se si è dimostrata una tolleranza verso l'acidità fino a pH 5,5.

Lo NaCl viene tollerato fino a concentrazioni del 5% mentre il 6% risulta praticamente inibente.

Il saccarosio esercita una batteriostasi pressochè completa a concentrazioni del 30%.

Attualmente stiamo anche saggiando l'influenza di diversi antifermentativi sullo sviluppo della Y. enterocolitica e i primi dati ci dimostrano una loro scarsa attività alle normali concentrazioni di impiego.

Sono allo studio, inoltre, le interazioni microecologiche tra Yersinia ed altri germi reperibili nei

prodotti alimentari quali coliformi, salmonelle, pseudomonas nonché lattobacilli e stafilococchi; tali indagini, in base a proposte dell'OMS, mirano a prevedere il livello di pericolosità di un alimento contaminato da Yersinia.

RICERCA DELLA YERSINIA ENTEROCOLITICA DAGLI ALIMENTI

ARRICCHIMENTO

g50 campione + ml 200 PSB

4°C per 7, 14 e 21 gg

RHC
(Wauters 1973)

BRODO SELENITO
(Lee, 1980-Stern 1980)

23°C per 3gg

ISOLAMENTO

- | | |
|---|--|
| MT (Mc Conkey+Tween 80) | colonie piccole e incolori |
| BS (agar solfito di bismuto) | colnie nere e traslucide |
| SS (agar Salmorella-Shigella) | colonie piccole e incolori |
| CIN (Cefasulodina-Irgasan-Novobiocina) | colonie centro rosso-alone trasparente |

I passaggi vanno eseguiti previo e non trattamento con alcali (Aulisio, 1980)

SCREENING

TSI

viraggio all'acidità
(no gas- no H₂S)

IDENTIFICAZIONE

- autoagglutinazione
- prove biochimiche
- prove sierologiche

Virus negli alimenti

Lo studio delle caratteristiche igieniche di un alimento dovrebbe comprendere, tra gli altri accertamenti, anche la ricerca dei virus trasmissibili o, almeno di alcuni di essi.

Al momento attuale vi è una carenza di dati per quanto concerne la presenza dei virus negli alimenti ma le ricerche finora condotte dimostrano la possibilità di trasmissione di virus patogeni all'uomo in seguito alla ingestione di alimenti contaminati. Tra questi, rivestono primaria importanza i virus enterici che probabilmente sono presenti in svariati alimenti a livelli significativi.

I virus sono generalmente più resistenti alle condizioni ambientali che non le cellule vegetative dei batteri; studi condotti da Larkin nel 1974 hanno dimostrato la persistenza dei poliovirus del tipo I per 36 gg in vegetali irrigati con acqua inquinata (1).

E' stata anche dimostrata la sopravvivenza degli enterovirus nella carne bovina per più di 8 giorni a 23-24°C e la loro presenza non subisce alcuna alterazione a causa della crescita della flora dello "spoilage".

Da alimenti di origine animale quali carne di bovini, suini e pesce sono stati isolati virus echo e polio. Tali virus sono stati, inoltre, frequentemente isolati da molluschi eduli lamellibranchi provenienti sia da acque approvate che da acque precluse. Secondo indagini svolte da Dennis nel 1974, dal 10 al 20% dei campio-

ni prelevati nei mercati di Francia conteneva virus (2,3).

Tali risultati, non certo tranquillizzanti, sono da correlare alle note caratteristiche di bioaccumulo dei molluschi in genere. Tali organismi, infatti, filtrano giornalmente enormi quantità di acqua dalla quale trattengono non solo il plancton necessario al loro metabolismo ma anche i batteri e i virus presenti nelle acque. I virus, in particolare, vengono trattiene dai molluschi per parecchi giorni anche dopo che questi sono stati trasferiti in acque di stabulazione pulite (4,5,6,7,8).

Studi condotti recentemente da Jones e Butler (1980) hanno dimostrato che il mollusco Dreissena polymorpha accumula rapidamente poliovirus a livelli circa 10 volte maggiori dell'acqua circostante. I virus si distribuiscono in tutti i tessuti ma maggiormente nell'intestino e nel materiale fecale; l'accumulo dei virus è più lento a 4°C che a 12°C o 24°C.

Le potenziali fonti di contaminazione degli alimenti da parte del virus sono illustrate nello schema seguente tratto da Larkin (1); essi possono derivare da animali infetti, da roditori ed insetti ma, come appare dalla figura, la sorgente principale è rappresentata dalle secrezioni ed escrezioni umane.

Da un punto di vista clinico si ricorda che i virus più significativi appartengono al gruppo degli enterovirus: nell'adulto, nel quale contatti precedenti con gli antigeni virali hanno già stimolato il sistema immunopoietico, l'infezione ha spesso un decorso inapparente o subclinico; nei bambini o negli individui immunodeficitari, invece,

l'infezione può manifestarsi a livello di sindrome, generalmente gastroenterica.

Da quanto premesso è difficile calcolare la dose infettante: essa può variare, per i poliovirus 1-2-3 da 1 a diverse centinaia di U.F.P. (unità formanti placca).

Per quanto concerne le norme igieniche profilattiche generali, la più significativa anche in base ad indagini degli ultimi anni, rimane quella del trattamento degli alimenti a temperature di circa 80°C, così come risulta da ricerche condotte su carne, latte e derivati e vegetali.

Il trattamento termico finale, peraltro non sempre applicabile a tutti gli alimenti, non può essere, ovviamente, disgiunto da tutta una serie di norme igieniche da adottare a monte del prodotto finito.

Così come accennato in precedenza, la ricerca di virus negli alimenti viene eseguita costantemente e presso laboratori altamente specializzati.

In questi ultimi anni, tuttavia, sono aumentate le ricerche per elaborare metodi analitici di più semplice esecuzione e di maggiore affidabilità.

La metodica attualmente più diffusa è quella elaborata da Sobsey e coll. nel 1977, per la determinazione degli enterovirus nelle ostriche (9).

Il metodo è illustrato nello schema seguente; esso permette il recupero di circa il 45% degli enterovirus presenti nell'alimento.

Più recentemente, nel 1981, Finance e coll. hanno messo a punto un metodo per l'isolamento degli enterovirus presenti in quattro differenti tipi di alimenti: carne, pesce, ostriche e mitili. (10).

L'adsorbimento viene ottenuto mediante variazione del pH; L'optimum di pH varia da un alimento all'altro ed è 4 per il pesce, 6 per le ostriche e i molluschi e 5,5 per la carne.

L'eluizione, anche in questo caso, analogamente al metodo di Sobsey, viene ottenuta mediante variazioni del pH e della conducibilità. Dopo centrifugazione, infatti, il sedimento viene eluito in ml 100 di acqua distillata, quindi il pH viene portato a 9 e la conducibilità a 8000 mg NaCl/l.

I virus, infine, vengono concentrati mediante ultrafiltrazione o ultracentrifugazione.

* * * * *

Presso il nostro laboratorio, è stata messa a punto una metodica per la ricerca dei virus nei molluschi, di facile e rapida esecuzione che è stata confrontata con le due tecniche precedentemente descritte.

Le indagini sono state effettuate su campioni contaminati sperimentalmente utilizzando sia omogeneizzati di mitili che mitili vivi, posti in apposite vasche di stabulazione. Le prove "in vivo" sono state eseguite allo scopo di effettuare una verifica della metodologia in condizioni riconducibili a quelle naturali, nonché di studiare l'eventuale distribuzione delle particelle virali, oltre che nei molluschi anche nelle acque e nei sedimenti.

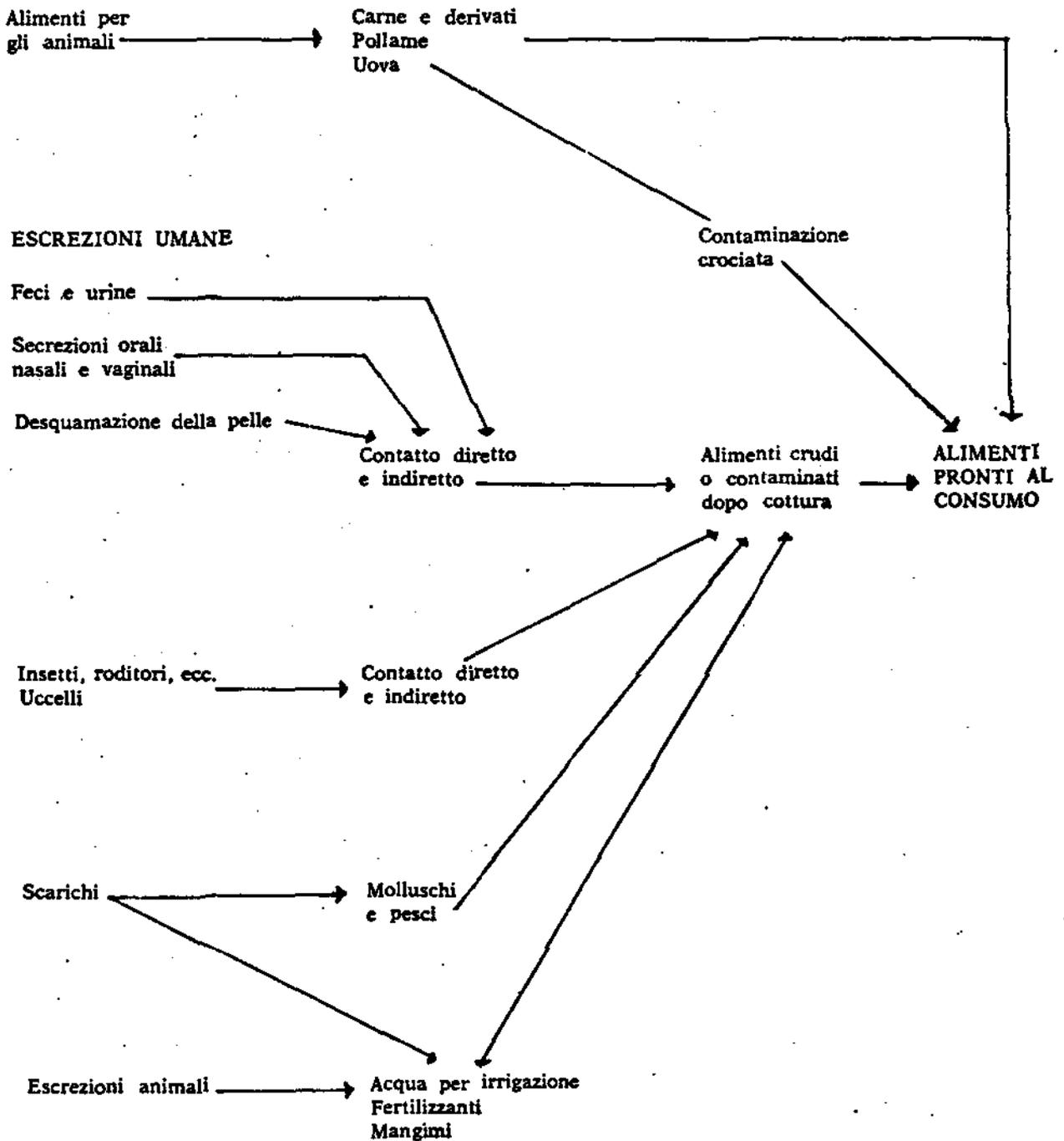
Per il recupero dei virus è stata da noi messa a punto una tecnica che prevede:

-omogeneizzazione del campione;

- eluizione del virus mediante "freezing-thawing" (congelamento in bagno di ghiaccio secco-etanolo e scogelamento in b.m. a 37°C per 4 volte) o mediante ultrasuoni (15" a 70 W);
- diluizione 1:1 con tampone fosfato 0,1 M, pH 7,2
- filtrazione per garza;
- centrifugazione a 10.000 g per 15';
- il surnatante viene saggiato su cellule mediante micro-metodo.

Tale metodica ci ha permesso di evidenziare basse concentrazioni di poliovirus, pari a $10 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$. IL metodo, di semplice e rapida esecuzione, può avere utile applicazione in sede di "scœening". Si può infatti rilevare che l'attrezzatura necessaria può essere alla portata anche di laboratori non particolarmente finalizzati ad indagini virologiche complesse.

Potenziali fonti di contaminazione virale degli alimenti.
(tratto da Larkin E.P. 1981).



Riferimenti bibliografici

- 1) Larkin E.P. 1981. Food contaminants - Viruses.
J. Food Protection 44, 4: 320-325
- 2) Gerba C.P., Goyal S.M. 1978 Detection and occurrence
of enteric viruses in shellfish: a review. J. Food
Prot. 41, 9: 743-754.
- 3) Toti L., De Felip G. 1982. Gli alimenti quali fonti di
trasmissione di virus. Riv. Soc. It. Scienza dell'Alimentazione. 4: 243-246.
- 4) Goyal S.M., Gerba C.P., Melnick J.L. 1979. Human enteroviruses in oyster and their overlying waters. Applied Environmental Microbiol. 37, 3: 572-581.
- 5) Metcalf T.G., Mullin B., Eckerson D., Moulton E., Larkin E. 1979. Bioaccumulation and depuration of enteroviruses by the softshelled clam, Mya arenaria. Appl. Environm. Microbiol., 39, 2: 275-282.
- 6) Sobsey M.D., Mackney C.R., Carrick R.J., Ray B., Speck M.L. 1980. Occurrence of enteric bacteria and viruses in oyster. J. Food Prot. 43, 2: 111-113.
- 7) Bedford A.J., William G., Bellamy A.R. 1977. Virus accumulation by the Rock Oyster Crassostrea glomerata. Appl. Environm. Microbiol. 35, 6: 1012-1018.
- 8) Young D.C., Sharp D.G. 1977. Poliovirus aggregates and their survival in water. Appl. Environm. Microbiol. 33, 1: 168-177.
- 9) Sobsey M.D., Carrick R.Y., Jensen H.R. 1978. Improved method for detecting enteric viruses in oyster. Appl. Environm. Microbiol. 36, 1: 121-128.

- 10) Finance C., Villeval F., Block J.C., Schwartzbréd L.
1981. Improved method for virological analysis of
food. Appl. Environm. Microbiol. 42, 1: 176-170.

METODI DI CONTROLLO DELLA QUALITÀ IGIENICA DELLE SUPERFICI DI LAVORO NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE.

Dott.ssa Luciana CROCI, Dott.ssa Silvana CIZZARELLI

Dott.ssa Laura TOTI

Laboratorio Alimenti - I.S.S.

Il controllo microbiologico dell'ambiente di lavoro destinato alla produzione degli alimenti (locali, superfici di lavoro, macchinari ed utensili) nonché del personale addetto, riveste particolare importanza nel quadro della qualità igienica del prodotto finito.

E' noto, infatti, che una pulizia inadeguata dei piani di lavoro, nastri e rulli di trasporto può comportare un incremento notevole della carica microbica di un alimento (1).

Come pure non deve essere sottovalutato l'apporto batterico che può provenire dal personale addetto alla lavorazione, sia per cessione diretta dei microrganismi presenti sulle mani, sia attraverso il materiale di desquamazione dello strato corneo, che notoriamente annovera germi appartenenti a varie specie, e che può venire a contatto con gli alimenti direttamente o indirettamente attraverso le superfici di lavoro su cui si deposita.

Da quanto sopra esposto risulta evidente l'importanza di disporre di metodi adeguati per giudicare l'idoneità delle misure di bonifica adottate nelle industrie alimentari, nelle fasi di produzione e distribuzione degli alimenti.

o o o o o o o o

Per la pulizia e la disinfezione vengono generalmente

impiegati prodotti chimici, che a seconda del loro campo di applicazione, possono essere suddivisi in:

- sostanze lavanti: detersivi o detergenti speciali, che hanno caratteristiche sgrassanti, ammorbidenti e detergenti;
- sostanze con attività di superficie (vengono usati come inibitori industriali);
- sostanze disinfettanti: questo gruppo oltre ad avere le caratteristiche suddette del potere lavante, dell'attività di superficie, presenta azione emulsionante ed un effetto microbicide caratteristico.

La scelta della sostanza da utilizzare viene fatta in base alle esigenze peculiari dell'ambiente da trattare e nel caso specifico delle industrie alimentari richiede maggiore cura.

Infatti, il particolare tipo di lavorazione, che comporta la presenza di residui organici notevoli nell'ambiente, crea un substrato idoneo alla proliferazione delle più svariate specie batteriche, ostacolando, inoltre, l'azione di molte delle sostanze disinfettanti normalmente impiegabili.

I detergenti ed i detergenti-disinfettanti da usare nelle industrie alimentari devono rispondere ai seguenti requisiti:

- essere efficaci nelle normali condizioni d'uso, cioè rimuovere i residui proteici e/o grassi associati alla lavorazione della carne o di altri prodotti;
- devono essere innocui per il personale;
- non devono corrodere o danneggiare le superfici o i mac-

chinari trattati;

- non devono alterare il colore o il sapore degli alimenti in contatto con le superfici e con i macchinari lavati con essi;
- devono essere facilmente eliminabili;
- devono essere sicuri e facili da usare;
- devono essere compatibili se mescolati.

I tensioattivi anfoteri si sono dimostrati assai utili perchè possiedono tali caratteristiche; inoltre, rispetto agli altri disinfettanti, presentano uno spettro d'azione più ampio che comprende anche diversi tipi di virus.

Come è stato descritto da molti Autori sembra che questa classe di sostanze formi un film germorepellente, che persiste anche dopo il risciacquo finale con acqua, sebbene il contenuto della sostanza attiva sulle superfici così trattate sia minimo.

Metodi di controllo

Per il controllo dell'effetto germicida di un disinfettante viene normalmente applicato il noto metodo, detto "5-5-5 test", riportato in Appendice.

Scopo della nostra esercitazione è invece quello di verificare l'effetto della disinfezione direttamente sulle superfici trattate.

A tal fine è necessario disporre di tecniche per il controllo microbiologico, che forniscano risultati attendibili e con una buona riproducibilità, da impiegare "routinariamente", prima e dopo la disinfezione dei macchinari e dei piani di lavoro.

Le metodiche riportate in letteratura sono numerose (2,3,4), tra queste ricordiamo:

- 1) metodo dei tamponcini di cotone;
- 2) metodo del disco di carta sterile;
- 3) metodo dell'impronta con terreni agarizzati nutritivi.

Le prime due tecniche citate danno risultati scarsamente riproducibili, per cui quella maggiormente usata è la terza, basata sull'impiego di strisce di plastica flessibile, su cui viene stratificato un idoneo terreno nutritivo, selettivo o meno (strisce Hygicult, già predisposte); oppure sull'impiego di piastre Petri-Contact (diametro cm 6) riempite di un adatto terreno di coltura. Le piastre così preparate o le strisce agarizzate vengono poste sulla superficie da esaminare, esercitando una modica pressione per 2-3". Si mettono poi ad incubare a temperature idonee.

L'applicazione pratica di questo metodo, da noi più volte impiegato su piani di lavoro variamente contaminati, ha dimostrato che nel caso questi contengano una elevata carica microbica non si hanno risultati quantificabili. Ciò si verifica anche nel caso di superfici non eccessivamente contaminate, in quanto è stato appurato che generalmente è presente una concentrazione batterica maggiore o uguale a 100 u.f.c./cm², che non è rilevabile a causa della confluenza delle colonie sulla superficie dell'agar.

Soltanto nel caso si sia appena effettuata una pulizia con detergenti o combinazioni di detergenti-disinfettanti, si possono ottenere risultati quantificabili; sia impiegando le piastre Petri-Contact che le strisce Hygicult.

Recentemente nel nostro laboratorio è stata eseguita

una serie di indagini allo scopo di trovare una tecnica che fornisca risultati più rappresentativi delle condizioni igieniche reali, ed applicabile in ogni evenienza.

A tal fine abbiamo condotto delle prove utilizzando il metodo di lavaggio con l'apparecchio "Direct-Skin" (IBI-Milano), originariamente ideato per il prelievo di microrganismi dalle superfici cutanee (J.Fleurette e H.J.Traisy, 1978).

Tale apparecchio consiste di un cilindro di vetro che viene appoggiato sulla superficie in esame, in esso viene introdotto, come liquido di lavaggio, soluzione fisiologica addizionata di Tween 80 all'1% e di lecitina all'1%. Quindi si immette l'apposita paletta sterile e si lascia ruotare per 15" a 4.000 giri/minuto circa.

Infine, si preleva il suddetto liquido di lavaggio e dopo aver eseguito opportune diluizioni si semina nei terreni nutritivi agarizzati.

Dopo incubazione si esegue il conteggio nel modo seguente: n° di microrganismi/cm² = 0,66 * x n^o di microrganismi/ml indiluito.

Questo metodo fornisce buoni risultati, con recuperi in media 2-3 volte superiori a quelli ottenuti con il metodo di impronta diretta, ma è idoneo soltanto per superfici estremamente levigate e perfettamente orizzontali.

Un'altra tecnica da noi messa a punto si basa sull'impiego di piastre Petri-Contact, riempite con ml 16 di ter-

* esprime il rapporto tra l'area della superficie esaminata ed il volume del liquido di lavaggio.

reno non-nutritivo con la seguente composizione:

Agar allo 0,7%

Tween 80 all'1%

Lecitina* all'1%

Tampone fosfato q.b.

pH = 7

che viene adoperato come tampone e sulla successiva eluzione del materiale prelevato.

Per l'esecuzione della prova la piastra viene appoggiata con modica pressione sulla superficie da esaminare, e ruotata di 360° tenendone fisso il centro; dalla zona centrale viene prelevato, dopo incisione con un tagliente di acciaio, un tassello di 4 cm².

Il tassello viene omogeneizzato con ml 40 di soluzione fisiologica, addizionata di ml 0,04 di Tween 80, adoperando lo "Stomacher" per circa 1' (oppure, non disponendo di tale apparecchio, agitando manualmente per circa 2' in beute contenenti sferette di vetro); infine si procede alla semina della soluzione e delle sue diluizioni scalari in terreni nutritivi agarizzati.

Dopo incubazione, il numero dei microrganismi/cm² sarà dato da 10 volte quello riferito ad 1 ml di omogeneizzato.

Le varie prove da noi effettuate, contaminando artificialmente diversi tipi di superfici con concentrazioni note di germi, hanno evidenziato che questo metodo consente

* la lecitina di soya presente nel substrato funge da neutralizzante dell'eventuale residuo di disinfettante.

in media recuperi pari a circa l'80% della quantità presunta di microrganismi.

Inoltre, tenuto conto delle difficoltà di fornire delle valutazioni medie a causa della estrema variabilità della contaminazione da un punto all'altro di una stessa superficie, possiamo affermare che i risultati presentano una buona riproducibilità, specialmente quando siano fissati rigidamente tutti i parametri operativi.

In conclusione quest'ultimo metodo è risultato particolarmente idoneo in tutte le condizioni - superfici di vario tipo, cariche batteriche elevate, ecc. - abbastanza sensibile nonché riproducibile, per cui se ne consiglia l'uso routinario.

Si ricorda, infine, che affinché il metodo fornisca una valutazione dell'avvenuta disinfezione, è indispensabile che nel terreno di prova venga incorporato un idoneo neutralizzante del disinfettante impiegato.

Tra le varie soluzioni neutralizzanti riportate da altri Autori in letteratura, ricordiamo quella utilizzata da Moiraghi e coll. in un recente lavoro (5).

APPENDICE

"555 TEST" metodo per la valutazione dell'efficacia dei disinfettanti nell'igiene degli alimenti.

1. Test di sospensione quantitativa per la determinazione dell'attività battericida e fungicida.

1.1. Scopo del test

Tale test serve a determinare il grado di azione battericida che si ottiene impiegando concentrazioni di disinfettante raccomandate nella pratica per l'igiene alimentare, e a classificare "i disinfettanti" o "i disinfettanti-detergenti combinati".

Tale valutazione, eseguita in laboratorio non fornisce comunque un giudizio circa l'efficacia del prodotto nelle sue applicazioni pratiche, che possono variare notevolmente.

1.2. Principio del metodo

Si allestiscono sospensioni di microrganismi che vengono aggiunti ad una soluzione contenente il prodotto in esame alla concentrazione raccomandata dal fabbricante.

Trascorso un certo periodo ad una data temperatura, si procede alla determinazione degli organismi sopravvissuti.

1.3. Organismi campione

Le prove vengono effettuate sia su batteri Gram-negativi che Gram-positivi.

Il prodotto viene inoltre esaminato per il suo effetto

sui lieviti.

Microorganismi campione: Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442, Salmonella typhimurium ATCC 12311, Staphylococcus aureus ATCC 6538, Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763.

1.4. **Mantenimento** dei ceppi

Si raccomanda la liofilizzazione dei ceppi per prolungarne la conservazione. I ceppi da utilizzare regolarmente vengono mantenuti su agar-triptone-soya-peptone (TSA) o su agar all'estratto di malto (MEA) a seconda che si tratti di batteri o lieviti.

Le colture vengono mantenute in frigorifero ($5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e trapiantate mensilmente.

1.5. **Coltivazione** dei ceppi

Dalle colture batteriche su TSA (2.1.) e da quelle di lieviti su MEA (2.3.) si eseguono delle subcolture in provette contenenti ml 10 di brodo al triptone-glucosio-soyae in provette con ml 10 di brodo all'estratto di malto (2.4.).

Si pone ad incubare a 30°C per 24 h (le subcolture di S.cerevisiae devono essere tenute sotto agitazione durante l'incubazione).

1.6. **Preparazione** degli inoculi

Centrifugare le brodocolture di 24 h dei ceppi non sporigeri a 2.000 g per 15'. Eliminare il supernatante e risospendere le cellule in ml 10 di diluente (ISC). **Centrifugare** di nuovo e risospendere le cellule in ml 5 di diluente.

Il numero di u.f.c. nella sospensione finale sarà ap-

prossimativamente di 10^9 /ml per i ceppi batterici e di $5 \cdot 10^7$ /ml per i lieviti.

Si raccomanda una conferma al nefelometro.

1.7. Preparazione del disinfettante

1.7.1. Preparazione della diluizione raccomandata per l'uso.

Si possono preparare concentrazioni dell'1% o più, pesando direttamente almeno 1 grammo del prodotto con la precisione di 1 mg, e diluendo con un opportuno volume di diluente (acqua a durezza standard).

Concentrazioni minori dell'1% si preparano allestendo diluizioni intermedie.

1.7.2. Determinazione

Saggiare l'agente alla concentrazione più bassa raccomandata dal fabbricante.

Il test deve essere condotto alla temperatura di 20°C . Riempire una beuta da ml 100 con 24 ml della soluzione del disinfettante in acqua di durezza standard; il numero di beute da allestire dipende dal numero di ceppi da saggiare.

Riempire un ugual numero di beute con ml 24 di acqua di durezza standard.

Porre tutte le beute sotto agitazione in b.m. a $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Per ciascun ceppo da saggiare porre in una provetta quantità uguali di sospensione batterica e di soluzione di albumina bovina (2.5.). Mescolare ed aggiungere ml 1 di tale mescolanza ad una beuta contenente il disinfettante, e ad una senza disinfettante. Dopo periodi di esposizione di 5, 10 e 20 minuti prelevare ml 1 di liquido ed inocularlo in una provetta

contenente ml 9 di liquido inattivante (2.6.) precedentemente tenuto a 20°C e ben mescolato.

Dopo 5' preparare diluizioni in ragione 10 da ciascuna provetta. Usare tali diluizioni per preparare piastre per la conta batterica in duplice.

Per il campione senza disinfettante (controllo)

usare diluizioni tali da ottenere non più di 300 u.f.c./ml e, se possibile, non meno di 20 u.f.c./ml.

Per saggiare invece l'azione del disinfettante è sufficiente usare la provetta contenente il liquido di inattivazione e la prima delle diluizioni in ragione 10.

Per preparare le piastre mescolare ml 1 della diluizione da saggiare con ml 20 di terreno disciolto a 44°C (TSA) per la conta batterica; di MEA per la conta dei miceti.

Si può usare anche il metodo per striscio utilizzando ml 0,1 delle diluizioni in esame.

Incubare le piastre a 30°C₊₁°C per 48 h e procedere alla conta delle colonie.

1.7.3. Saggio della avvenuta inattivazione

Il test di seguito riportato serve ad accertare che, dopo l'inattivazione, non sia rimasto alcun residuo attivo di disinfettante.

Tale test viene condotto utilizzando ceppi di S.aureus ATCC 6538 e Ps.aeruginosa ATCC 15445 usando l'acqua con durezza standard al posto del disinfettante.

Procedere come descritto in 1.7.2. apportando le seguenti modifiche: dopo il tempo test di 5', prelevare da ciascuna beuta ml 1 di liquido e diluire 1:10000

in acqua a durezza standard.

Aggiungere ml 1 di tale diluizione in una provetta contenente ml 9 di liquido di inattivazione (2.6.) al quale è stato addizionato ml 1 del disinfettante alla concentrazione in esame.

Preparare le piastre per la conta batterica in duplice; sia da tale provetta che dalla diluizione 1/10.

Il numero di colonie ottenute non dovrà mai essere inferiore alla metà di quelle ottenute dal test di controllo senza il disinfettante (1.7.2.).

1.8. Calcolo dell'effetto microbicida

L'effetto microbicida dovuto all'azione che il disinfettante compie in 5, 10 e 20 minuti a 20°C (ME_{5}^{20})

(ME_{20}^{20}) è espresso dalla formula:

$$ME = \log N_c - \log N_d$$

N_c = numero di u.f.c./ml risultati dalla prova senza disinfettante

N_d = numero di u.f.c./ml dopo l'azione del disinfettante.

Calcolare tutti i logaritmi fino alla seconda cifra decimale.

1.9. Criterio di valutazione

Si richiede che un disinfettante, alla più bassa diluizione di impiego raccomandata dal fabbricante, abbia un'azione microbicida tale da provocare una riduzione di almeno 5 log.

2. Terreni e reagenti

2.1. Agar triptone-soya-peptone

Triptone (digestione pancreatica di caseina)	15	g
Soya-peptone	5	g
NaCl	5	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	ml

Sterilizzare a 120°C per 20', pH 7,3 \pm 0,1

2.2. Brodo triptone-glucosio-soyapeptone

Triptone (digestione pancreatica di caseina)	17	g
Soyapeptone	3	g
Glucosio; destrosio	2,5	g
NaCl	5	g
K_2HPO_4	2,5	g
Acqua distillata	1000	ml

Sterilizzare a 120°C per 20'.

2.3. Agar all'estratto di malto

Polvere di estratto di malto	30	g
Soyapeptone	5	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	ml

Sterilizzare a 115°C per 10', pH 5,4 \pm 0,1.

2.4. Brodo all'estratto di malto

Polvere di estratto di malto	17	g
Soyapeptone	3	g
Acqua distillata	1000	ml

Sterilizzare a 115°C per 10', pH 5,4 \pm 0,1.

2.5. Soluzione di albumina bovina

Albumina bovina	15	g
Acqua distillata	1000	ml
Sterilizzare per filtrazione (pori di 0,45 μ m)		

2.6. Liquido di inattivazione*

Lecitina (ottenuta dalla soya, purificata)	3	g
Polisorbato 80	30	ml
Sodio-tiosolfato	5	g
L-Istidina	1	g
Tampone fosfato 0,25 N (2 g.)	10	ml
Acqua distillata	fino a	1000 ml
Sterilizzare a 120°C per 20'.		

2.7. Tampone fosfato 0,25 N

KH_2PO_4	34	g
Acqua distillata	500	ml
Aggiustare il pH a $7,2 \pm 0,1$ con NaOH 1 N		
Acqua distillata fino a	1000	ml
Sterilizzare a 120°C per 20'.		

*Per l'inattivazione di ammonio quaternario e composti anfoteri aggiungere ml 50 di siero di cavallo inattivato per litro.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Cantoni C.: "Focolai di inquinamento microbico nella produzione di prodotti cotti di salumeria". Atti II Colloquio italiano di Igiene. Milano 1974.
- 2) Baldock J.D.: "Microbiological monitoring of the food plant: methods to assess bacterial contamination on surfaces". J. Milk Food Technol. 37, 361, 1974.
- 3) Lamé H.: "Etude comparative de trois methodes d'appréciation de la flore microbienne de surface". Revue Med. Vet. 129, 615, 1978.
- 4) Favero M.S. et al.: "Microbiological sampling of surfaces". J. Appl. Bact. 31, 336, 1968.
- 5) Moiraghi Ruggenini A. et al.: "La disinfezione in ospedale. Approccio metodologico e risultati della valutazione di principi battericidi". Igiene Moderna, N.6, dicembre, 1981.

Allegato alla nota per l'avvio di un sistema
di sorveglianza delle tossinfezioni alimentari in Italia

Dr. Donato Greco, Dr. Guerino Piero Piersante, Dr. Francesco Rosmini
Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica - I.S.S.

Guida alla compilazione della scheda di sorveglianza sulle T.A.

Oggetto della sorveglianza è qualsiasi episodio epidemico in cui:

- a) siano interessate due o più persone (in caso di Botulismo ne basta una sola);
- b) si presuma un'origine alimentare;
- c) si disponga di informazioni utili per l'indagine epidemiologica, oppure dei risultati di laboratorio.

E' sempre consigliabile, comunque, segnalare tutte le epidemie in cui la fonte alimentare sia evidente o fortemente sospettata (ad es. perché interessa comunità chiuse, mense, banchetti di nozze, ecc.) anche se non si hanno tutti i dati epidemiologici, o di laboratorio, per confermare l'etiologia.

Tutti gli operatori di sanità pubblica che vengono a conoscenza di una epidemia da alimenti sono vivamente invitati a segnalare il fatto. Il nostro sistema di sorveglianza è volontario. Include persone che lavorano in organismi che vengono a contatto col problema in seconda istanza (Laboratori di Igiene e Profilassi, Osservatori Epidemiologici Regionali, Uffici dei Medici Provinciali, Istituti di Igiene Universitari) oppure che ne hanno competenza diretta (Servizi di Igiene Pubblica delle USL, Uffici Comunali d'Igiene). In quest'ultimo caso è augurabile che i nostri referenti sollecitino le varie fonti locali (medici di base, laboratori di analisi, Pronto Soccorso, ecc.) a segnalare tempestivamente i fatti, in modo da intervenire in tempo utile per effettuare eventuali prelievi biologici o alimentari e per svolgere proficuamente l'inchiesta epidemiologica.

La scheda da noi predisposta appare come uno strumento utile anche a fini conoscitivi locali. Essa rappresenta, evidentemente, una

sintesi di notizie precedentemente raccolte, secondo uno schema di indagine ben definito. Cercheremo di mettere in evidenza le caratteristiche principali e le varie fasi del modello da noi proposto. Precisiamo che non è necessaria nessuna conoscenza preliminare di epidemiologia o di biostatistica. Lo stesso microbiologo troverà utile applicare questo modello. Compilando la prima parte della scheda di sorveglianza egli potrà ricavare orientamenti per le sue indagini di laboratorio. Egli sarà spinto a cercare tutti i possibili agenti nell'alimento incriminato epidemiologicamente, anziché uno specifico agente in tutti i campioni disponibili.

La situazione tipica cui si fa riferimento è quella in cui si può individuare immediatamente la recente consumazione di un pasto in comune tra i colpiti. (Se il problema è diverso - ad esempio, se si vuole analizzare la possibilità che qualche alimento sia responsabile di un piccolo epidemico rilevato in una comunità più allargata - allora può essere richiesto un altro tipo di approccio; in tal caso, si consiglia di sollecitare l'intervento di un epidemiologo).

Nei nostro caso la prima cosa da fare è ottenere la lista completa dei cibi serviti. Se si tratta di un ristorante, essa sarà fornita dal gestore. Possibilmente raccogliere una descrizione sommaria dei processi di preparazione e notizie sulla fonte delle materie prime, seguendo lo schema dei punti 9, 10 e 11 della scheda. (Naturalmente occorre effettuare prelievi di tutti i residui di cibo disponibili, anche dagli stessi utensili, ed inoltre sottoporre ad ispezione gli addetti alla lavorazione, non trascurando di informarsi sugli assenti e sul motivo e la data dell'assenza).

Il secondo elemento indispensabile per l'indagine è l'elenco con l'indirizzo delle persone che hanno consumato lo stesso pasto. Se c'è stato un banchetto, rivolgersi a chi ha fatto gli inviti. È importante includere nell'elenco le persone che non hanno accusato disturbi.

La fase successiva è quella delle interviste, da fare attraverso schede individuali. Per ciascuna persona bisogna indicare quale cibo ha mangiato e quale non ha mangiato. Inoltre, per chi ha accusato disturbi, occorre specificare: quali sintomi ha manifestato; entro quanto tempo (in ore e giorni) dal pasto essi sono comparsi; quanto

tempo è durata la malattia. Naturalmente, ogni scheda singola conterrà: nome, cognome, indirizzo e numero telefonico della persona intervistata. Il telefono è un mezzo molto comodo per ottenere le interviste. Ci sembra utile ricordare che in questi casi le persone intervistate tendono a fornire una serie di informazioni ridondanti e fuorvianti. E' buona norma presentarsi con uno schema di intervista già predisposto e chiedere di rispondere solo alle domande che vengono poste dall'intervistatore. Non alleghiamo un modulo-tipo di scheda individuale, ma abbiamo esposto tutti i criteri necessari per costruirlo.

Adesso è possibile accingersi alla sintesi dei dati. E' opportuno riportare su una tabella riassuntiva l'elenco delle persone intervistate e le informazioni ricavate sul tipo di sintomi, sui loro tempi di insorgenza e di durata e sui cibi consumati. Questo permetterà, forse, di trarre un suggerimento sui possibili agenti causali, in relazione ai tempi di incubazione caratteristici (v. tavola sinottica alla fine). Soprattutto renderà agevole rispondere ai punti 4, 5, 6 e 7 della scheda di sintesi da noi fornita.

Particolare attenzione va rivolta al punto 7. Un'attenta ricostruzione dei dati, ottenuti attraverso lo schema predisposto al punto 7, consente di identificare l'alimento responsabile dell'epidemia. Si procede nel modo seguente.

La percentuale di malati sul totale delle persone che hanno mangiato un particolare cibo (esposti) ci darà il tasso di attacco specifico per quel cibo. La percentuale di malati sul totale di coloro che non hanno mangiato quel cibo ci darà il tasso dei non esposti. Il rapporto tra il tasso degli esposti e quello dei non esposti esprimerà il rischio relativo (RR) associato a quel dato cibo. In altre parole: quante volte di più si è rischiata la malattia avendo mangiato quel cibo, anziché non avendolo mangiato.

Talvolta più di un alimento può essere associato ad un alto rischio relativo. In tal caso è bene indagare sui processi di preparazione: spesso si troverà che i due alimenti hanno un ingrediente in comune. Altre volte la cosa si spiega con l'abitudine a consumare alcuni cibi accoppiati tra loro (ad esempio: arrosto e patate) uno solo dei quali è il vero responsabile.

L'alimento (o gli alimenti) con il più alto rischio relativo è quello che ha la più alta probabilità di essere stato la causa dell'epidemia.

Per dimostrarne rigorosamente il ruolo etiologico occorre, evidentemente, la conferma del Laboratorio, almeno dal punto di vista forense. Il solo risultato epidemiologico, tuttavia, è abbastanza probante per orientare scientificamente l'attività di sorveglianza e di prevenzione.

Pertanto l'evidenza epidemiologica, tanto più se confortata da un accertamento di laboratorio mirato, indicherà in quale direzione cercare le cause del fatto. L'obiettivo è quello di individuare le azioni ed i procedimenti scorretti o inadeguati che hanno reso possibile il fenomeno, per poter fornire agli interessati tutte le informazioni necessarie a correggere le condizioni di rischio.

La raccomandazione finale che rivolgiamo a tutti gli interessati è quella di segnalare, comunque, gli episodi di T.A. di cui si viene a conoscenza. Non importa se le notizie sono incomplete; se le indagini non vengono eseguite fino in fondo o non portano ad un risultato certo. In questa fase iniziale abbiamo bisogno di dati: anche la semplice descrizione del fatto ed il numero di persone coinvolte saranno apprezzati. I dati, che noi restituiremo tramite il Bollettino Epidemiologico Nazionale, terranno conto della maggiore o minore completezza delle indagini e dell'attendibilità dei risultati.

Ci sembra utile completare questa guida con una "Tavola sinottica delle più frequenti Tossinfezioni Alimentari" e con uno schema riassuntivo dei "Fattori causali in una T.A."

Tavola sinottica delle più frequenti Tossinfezioni Alimentari

PERIODO DI INCUBAZIONE	SINTOMI E SEGNI PREDOMINANTI	AGENTE	CAMPIONI DA RACCOGLIERE	ALIMENTI COINVOLTI E FATTORI CONTRIBUENTI
Da qualche minuto a poche ore.	Vomito, dolori addominali, diarrea, shock.	Metalli pesanti.	Vomito.	Cibi acidi conservati in utensili conteneti metalli pesanti.
Da qualche minuto a poche ore.	Capogiro, difficoltà di linguaggio, parestesie, paralisi, midriasi.	Tossine ittiche.		Molluschi e pesci, o loro parti, conteneti tossine.
Da qualche minuto a poche ore.	Vomito, salivazione, ipotensione, asma, miosi.	A. muscaria, A. panterina, alcune specie di Boletus e Inocybe.	Vomito.	Varietà di funghi poco conosciuti.
1-6 ore.	Vomito, diarrea occasionale.	Enterotossine: di Staphylococcus species, di B. cereus*.	Vomito, feci, tamponi nasofaring. ocul. di manipolatori.	Carni, salse e creme contaminate dall'uomo dopo la cottura e tenute per molte ore o gg. prima del consumo a T° fra 4-60° C.
			Vomito, feci.	Riso contaminato dal suolo prima della cottura e tenuto in condizioni favorevoli di tempo e T°.
6-12 ore.	Dolori addominali, diarrea, crampi muscolari, sonnolenza, midriasi, ittero emolit., coma.	A. phalloides, A. rubescens, A. verna.	Urine, sangue, vomito.	Varietà di funghi poco conosciuti.
6-18 ore.	Dolori addominali, diarrea acquosa.	Enterotossine: di Cl. perfringens, di B. cereus*.	Feci.	Carni e salse contaminate dal suolo o dall'uomo, prima della cottura e tenute in cond. favorevoli.
			Feci.	Cereali e vegetali contaminati dal suolo prima della cottura (c.s.).

N.B. Nelle forme finora descritte la durata dei sintomi è inferiore alle 24 ore.

* ceppi diversi.

PERIODO DI INCUBAZIONE	SINTOMO E SEGNI PREDOMINANTI	AGENTE	CAMPIONI DA RACCOGLIERE	ALIMENTI COINVOLTI E FATTORI CONTRIBUENTI
Da qualche ora ad una settimana	Sintomi gastrointestinali possono precedere la paralisi dei nn. cranici.	Neurotossine di Cl. botulinum.	Sangue, feci.	Cibi conservati, contaminati dal suolo e non sterilizzati.
6-48 ore.	Dolori addominali, diarrea, vomito, cefalea, febbre.	E.coli enterotogeno, Salmonella sp., V.parahaemolyticus, o loro enterotossine.	Feci o tamponi rettali.	Cibi vari contaminati in origine o dalle acque di lavaggio o dall'uomo, prima o dopo la cottura, cotti in modo inadeguato o tenuti in condizioni favorevoli di tempo e T°.
1-3 gg.	Come sopra, ma con caratteristica diarrea muco-emorragica.	Shigella sp.	Feci o tamponi rettali.	Come sopra, ma con dato dominante ruolo dell'uomo, unico serbatoio.
1-3 gg.	Dolori addominali, diarrea profusa "ad acqua di riso", vomito, sete, shock.	Enterotossina di V.cholerae.	Feci.	Molluschi crudi da allevamenti contaminati e cibi lavati con acque contam. non trattate, in zone endemiche.
1-3 gg.	Angina, febbre, vomito.	Streptococcus pyogenes.	Tampone faringeo, vomito.	Latte contaminato, non pastorizzato. Cibi cotti contaminati dall'uomo in fetto e tenuti in condizioni favorevoli.
1-7 gg.	Dolori addominali, diarrea, cefalea, febbre.	Y. enterocolit., Campylobacter fetus, jejuni.	Feci, sangue.	Acqua, latte e cibi di origine animale, contam. prima o dopo la cottura, cotti in modo inadeguato o tenuti in cond. fav.
1-7 gg.	Come sopra e vomito.	Virus: - enterovirus, - rotavirus, - Norwalk.	Feci.	Come sopra.

N.B. Da questa tavola sono escluse: la Brucellosi, la F. tifoide, l'Epatite virale A, ed alcune parassitosi (Giardiasi, Amebiasi, Teniasi) perchè il lungo periodo di incubazione (in genere alcune settimane) le rende poco adatte ad essere affrontate con il metodo qui presentato.

FATTORI CAUSALI IN UNA TOSSINFEZIONE ALIMENTARE

1. Agente etiologico.
2. Fonte e serbatoio dell'organismo.
3. Modo di trasmissione dell'organismo dalla fonte al cibo.
4. Il cibo contaminato deve essere favorevole alla crescita dell'organismo.
5. Il cibo che è stato contaminato deve essere lasciato per sufficiente tempo a temperatura adatta alla moltiplicazione dell'organismo sino a dose patogena di organismi o loro tossine.
6. La quantità di cibo ingerita deve contenere una quantità di organismi o tossine sufficienti a sorpassare la soglia di suscettibilità della persona che ha mangiato quel cibo.

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

11. SCHEDA
[] [] [] [] []

SORVEGLIANZA DELLE TOSSINFEZIONI ALIMENTARI

DATA DI COMPILAZIONE
[] [] [] [] [] [] [] []

LA COMPILAZIONE DI QUESTA SCHEDA E' VOLONTARIA, MA E' NECESSARIA PER COMPRENDERE IL RUOLO DEGLI ALIMENTI NELLE EPIDEMIE. LE INFORMAZIONI CONTENUTE SONO RISERVATE E SOTTOPOSTE A VINCOLO DI RISERVATEZZA PROFESSIONALE.

1. DOVE E' AVVENUTO IL FOCOLAI O EPIDEMICO?

REGIONE _____ USL _____ COMUNE _____ PROVINCIA _____

2. DATA DELL'EPIDEMIA: INIZIO DEL CASO [] [] [] [] [] [] INIZIO DELL'ULTIMO CASO [] [] [] [] [] []

3. INDICARE IL NUMERO REALE STIMATO

CI: PERSONE ESPOSTE	[] []	[] []	
PERSONE MALATE	[] []	[] []	
OSPEDALIZZATE	[] []	[] []	
CASI FATALI	[] []	[] []	

4. ANAMNESI DELLE PERSONE ESPOSTE:

N. ANAMNESI OTTENUTE	[] [] [] []
N. DI PERSONE CON SINTOMI	[] [] [] []
CON NAUSEA	[] [] [] []
CON VOMITO	[] [] [] []
CON CRAMPI ADDOMINALI	[] [] [] []
ALTRO SPECIFICARE _____	[] [] [] []

5. PERIODO DI INCUBAZIONE IN ORE:

IL PIU' CORTO [] [] [] IL PIU' LUNGO [] [] []
IN MAGGIORANZA [] [] []

6. DURATA DELLA MALATTIA IN ORE:

LA PIU' BREVE [] [] [] LA PIU' LUNGA [] [] []
IN MAGGIORANZA [] [] []

7. TASSI DI ATTACCO SPECIFICI PER ALIMENTO.

CIBO SERVITO ELENCARE FINO A 10 ALIMENTI SERVITI	N. DI PERSONE CHE HANNO MANGIATO IL CIBO SPECIFICATO				N. DI PERSONE CHE NON HANNO MANGIATO IL CIBO SPECIFICATO				R R
	MALATI	SANI	TOTALE	%MALATI	MALATI	SANI	TOTALE	%MALATI	
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									

8. VEICOLO RESPONSABILE (ALIMENTO IDENTIFICATO DALL'INDAGINE EPIDEMIOLOGICA) _____

9. MODO IN CUI IL CIBO IDENTIFICATO E' STATO MESSO IN COMMERCIO

CIBO INDUSTRIALE []	FRESCO []
CIBO ARTIGIANALE []	PREPARATO []
A TEMP. AMBIENTE []	SPUSO []
IN CALDO []	GIA' CONFEZIONATO []
REFRIGERATO []	IMPACCATO []
CONGELATO []	ALTRO SPECIFICARE []

SE SI TRATTA DI PRODOTTO COMMERCIALE INDICARE LA DITTA E IL LOTTO _____

10. POSTO DI PREPARAZIONE DEL CIBO IDENTIFICATO

RISTORANTE []
ROSTICCERIA []
MENSA []
CASA PRIVATA []
ALTRO SPECIFICARE _____ []

11. POSTO DI CONSUMO DEL CIBO IDENTIFICATO

RISTORANTE []
ROSTICCERIA []
MENSA []
CASA PRIVATA []
ALTRO SPECIFICARE _____ []

DATA DI PREPARAZIONE [] [] [] [] [] [] DATA DI CONSUMO [] [] [] [] [] []

BARRARE TUTTE LE VOCI UTILI

DATI DI LABORATORIO (INCLUDERE RISULTATI NEGATIVI)

12. CAMPIONI DI CIBO ESAMINATI.
SPECIFICARE CON UNA X SE SI TRATTA DI CIBO ORIGINALMENTE COINVOLTO NELL'EPIDEMIA O DI ANALOGO PRELEVATO SUCCESSIVAMENTE MA NON CONSUMATO DAGLI ESPOSTI DELL'EPIDEMIA.

TIPO	ORIG.	ANAL.	RISULTATI	
			QUALITATIVI	QUANTITATIVI
(ES. CARNE)	X		CL. PERFRIGENS	2x10 ⁶ /GR

13. CAMPIONI DA PAZIENTI (FECE, SANGUE, VOMITO, ETC.)

TIPO (ES. FECE)	N. PAZIENTI 12	RISULTATI (CL. PERFRIGENS)

14. CAMPIONI DA ALIMENTARISTI (FECE, LESIONI CUT., ETC.)

TIPO	RISULTATI

15. CAMPIONI AMBIENTALI

TIPO (ES. TRITACARNE)	RISULTATI (CL. PERFRIGENS)

16. FATTORI CHE HANNO CONTRIBUITO ALL'EPIDEMIA:
1. SCORRETTO MANTENIMENTO DELLA TEMPERATURA
 2. COTTURA INADEGUATA
 3. CONTAMINAZIONE DELL'ATTREZZATURA
 4. CIBO CITTEMUTO DA FONTI INCERTE
 5. CATTIVA IGIENE DELL'ALIMENTARISTA
 6. CONTAMINAZIONE DI CIBI COTTI CON CIBI CRUDI
 7. PIU' DI UN GIORNO TRA PREPARAZIONE E CONSUMO
 8. ALTRO SPECIFICARE

17. ETIOLOGIA:

	ACCERTATO	SOSPETTO
MICROBICA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CHIMICA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ALTRE (SPECIFICARE)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SCONOSCIUTA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

BARRARE TUTTE LE VOCI UTILI

18. NOTE: DESCRIVERE BREVEMENTE EVENTUALI ASPETTI RILEVANTI DELL'INDAGINE NON RILEVATI NELLA PRESENTE SCHEDA; AGGIUNGERE ALTRI FOGLI, SE NECESSARIO. QUANDO E' POSSIBILE, INDICARE IL LUOGO O IL PUNTO DELLA CATENA DI PREPARAZIONE IN CUI IL CIBO E' STATO CONTAMINATO, SPECIFICANDO SE PRESUNTO O CERTO.

NOME DEL COMPILATORE _____
 INDIRIZZO _____ TELEFONO _____
 LABORATORIO/SERVIZIO _____
 DATA DELL'INDAGINE / /

SI PREGA DI INVIARE LA SCHEDA, ANCHE SE INCOMPLETA, NEL PIU' BREVE TEMPO DALLA CONOSCENZA DEL FATTO A:
 SOPVEGLIANZA DELLE TOSSINFEZIONI ALIMENTARI
 LABORATORIO DI EPIDEMIOLOGIA E BIostatISTICA
 ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
 V.LE REGINA ELENA, 299 - 00161 ROMA

EVENTUALI COMUNICAZIONI URGENTI POSSONO ESSERE FATTE AL NUMERO DI TELEFONO (06/4584617)
 L'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA', SU INVITO DELLE STRUTTURE DEL S.S.N. E DISPONIBILE AD OFFRIRE ASSISTENZA NELLE INDAGINI.

Si ringrazia la Sig.na Stefania Salinetti della Segreteria del Laboratorio Alimenti dell'Istituto Superiore di Sanità, per la collaborazione tecnica.

***La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei rapporti ISTISAN è dei singoli autori***

***La riproduzione parziale o totale dei "Rapporti ISTISAN"
deve essere preventivamente autorizzata dai
competenti Direttori di Laboratorio o Servizio***

***Stampato dalla Biblioteca - Settore editoriale
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - Roma***

Roma, luglio 1984