

ZANICHELLI

Fabio Fanti

Biologia, microbiologia e tecnologie di controllo sanitario

Gli alimenti:

Le malattie trasmesse

Il controllo
microbiologico

Infezioni, intossicazioni, tossinfezioni

Intossicazioni: tossine di origine animale o vegetale possono essere presenti negli animali e nelle piante impiegati come cibo, oppure essere prodotte dai microrganismi sviluppati negli alimenti o che abbiano contaminato l'alimento durante le fasi di produzione e conservazione.

Infezioni alimentari: sono causate dall'ingestione dei microrganismi patogeni presenti nell'alimento.

Tossinfezioni di origine alimentare: si registra sia l'ingestione e la presenza di batteri, sia la produzione nell'organismo ospite delle relative tossine.

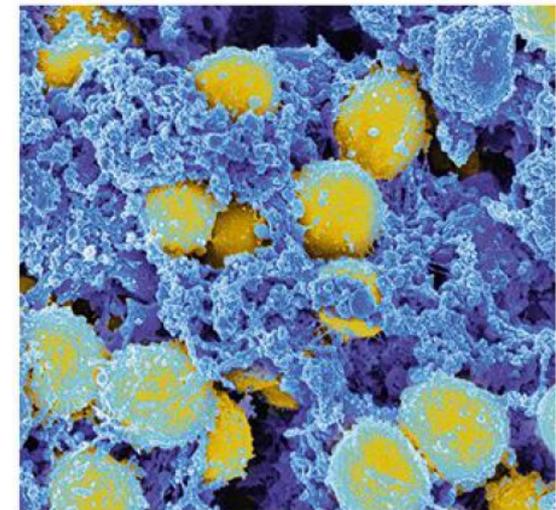
Intossicazione da enterotossina di stafilococchi patogeni

Gli **stafilococchi** sono batteri ubiquitari (diffusi in tutti gli ambienti) e quindi in grado di contaminare facilmente gli alimenti. Fanno parte della flora microbica commensale delle vie respiratorie e gastroenteriche.

Producono vari tipi di **tossine** ad attività citolitica (leucocidine, emolisine).

Alcuni elaborano **enterotossine** (ad azione intestinale) in grado di provocare una sindrome gastroenterica.

Gli stafilococchi sono eliminati con facilità dall'esposizione al calore, mentre le tossine da essi prodotte sono termoresistenti.



Staphylococcus aureus al microscopio elettronico.

Tossinfezione da *Escherichia coli*

Escherichia coli fa parte degli enterobatteri: bacilli Gram negativi aerobi/anaerobi facoltativi e asporigeni ad habitat intestinale degli animali a sangue caldo. Si distinguono alcune centinaia di varietà o sierotipi diversi.

Fa parte dei **coliformi**: un raggruppamento (senza valore tassonomico) che comprende vari generi di *Enterobacteriaceae* in grado di fermentare il lattosio con produzione di acido e gas.

La causa più frequente di tossinfezione consiste nel consumo di bevande o alimenti (es. carni crude) contaminate da ceppi patogeni, in grado di invadere la mucosa intestinale e/o di produrre potenti tossine.



Escherichia coli al microscopio elettronico.

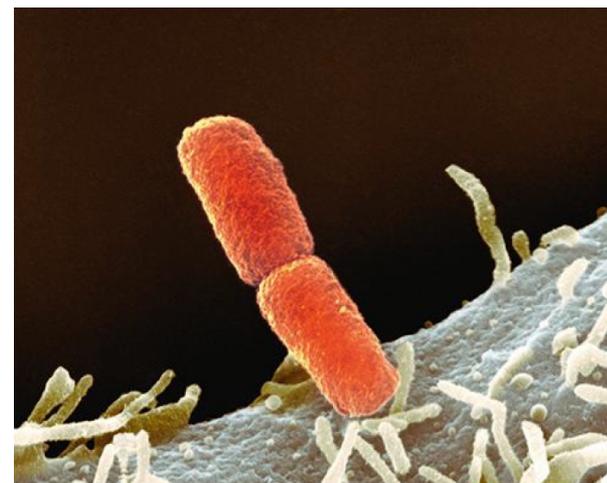
Tossinfezione da *Shigella*

Gli enterobatteri appartenenti al genere ***Shigella*** causano la dissenteria bacillare o shigellosi, una sindrome severa con emissione di muco e sangue nelle feci.

Le shigelle non diffondono nel circolo sanguigno raggiungendo altre sedi anatomiche, ma si moltiplicano nel colon.

La shigellosi è diffusa soprattutto nei Paesi caldi in presenza di bassi livelli igienico sanitari, dove si possono verificare epidemie attraverso l'acqua e gli alimenti.

La conservazione dei cibi in ambiente refrigerato blocca la moltiplicazione dei batteri, che vengono eliminati con la pastorizzazione



Enterobatteri del genere *Shigella* al microscopio elettronico.

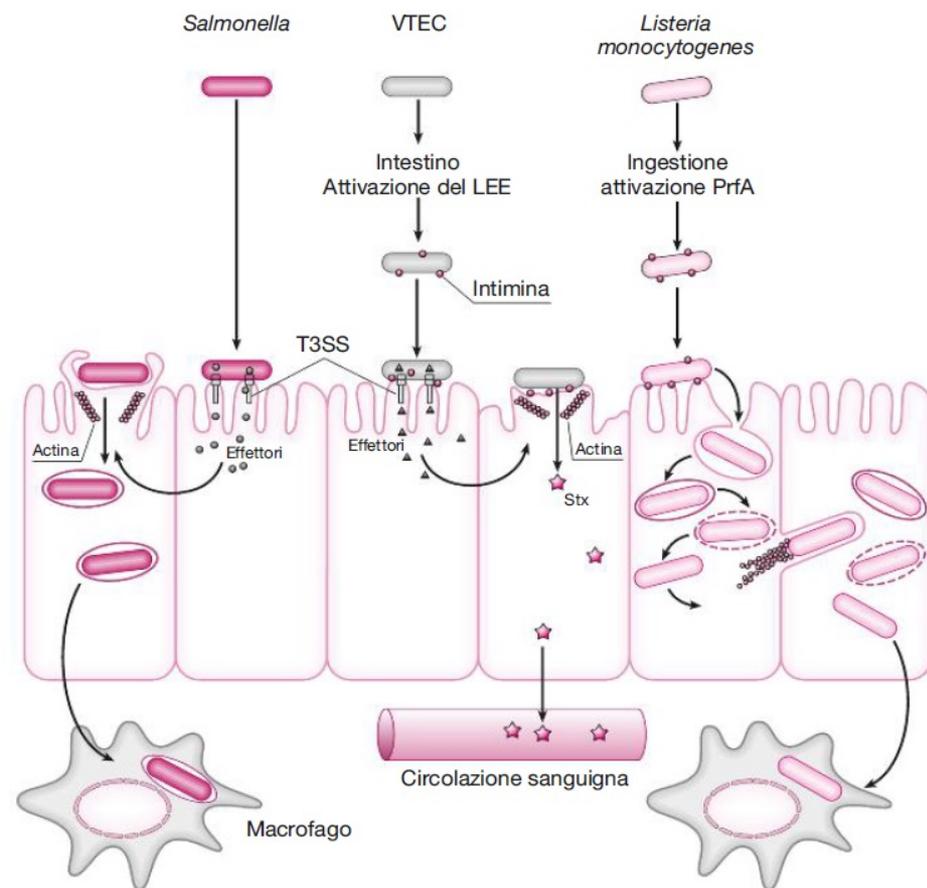
Tossinfezione da *Salmonella*

Le salmonelle sono la seconda causa di tossinfezioni alimentari in Europa e la prima negli USA.

L'habitat consueto è l'intestino degli animali.

Si distinguono in:

- salmonelle tifoidee patogene solo per l'uomo; responsabili del **tifo addominale** e del paratifo
- salmonelle non tifoidee che causano tossinfezioni gastroenteriche (**salmonellosi**)



L'effetto delle gastroenteriti.

Tossinfezione da *Yersinia enterocolitica*

Al genere *Yersinia* appartengono tre specie implicate in malattie umane:

- *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis*, che causano tossinfezioni alimentari
- *Yersinia pestis*, agente eziologico della peste

Yersinia enterocolitica è un enterobatterio psicrotrofo in grado di sopravvivere e moltiplicarsi negli alimenti anche in ambiente refrigerato: i ceppi pericolosi per l'uomo producono una enterotossina termoresistente.

La tossinfezione si contrae con l'ingestione di alimenti, soprattutto quelli a base di carne suina, crudi o poco cotti.

Tossinfezione da *Cronobacter sakazakii*

Cronobacter sakazakii è un enterobatterio in grado di resistere in alimenti a basso a_w ed è responsabile di setticemia, e meningite neonatale ed enterocolite, a seguito dell'ingestione di formulazioni a base di latte in polvere reidratato e conservato a temperatura che favorisce lo sviluppo del batterio.

È in grado di produrre una sostanza capsulare molto viscosa che ne determina un'alta adesività alle superfici, soprattutto in lattice, policarbonato e silicone, materiali impiegati nella fabbricazione di contenitori e utensili per il latte in polvere e per il prodotto reidratato.

Botulismo

La neurotossina prodotta da *Clostridium botulinum* (bacillo Gram positivo sporigeno anaerobico) è la più potente che si conosca, in grado di provocare il **botulismo**, un'intossicazione che spesso ha esito letale.

La tossina agisce attaccando il sistema nervoso centrale e periferico: blocca la liberazione dalle sinapsi neuromuscolari di acetilcolina, mediatore chimico dell'impulso nervoso.

Le spore hanno un'ampia diffusione ambientale, possono contaminare molti alimenti e sono molto resistenti al calore.

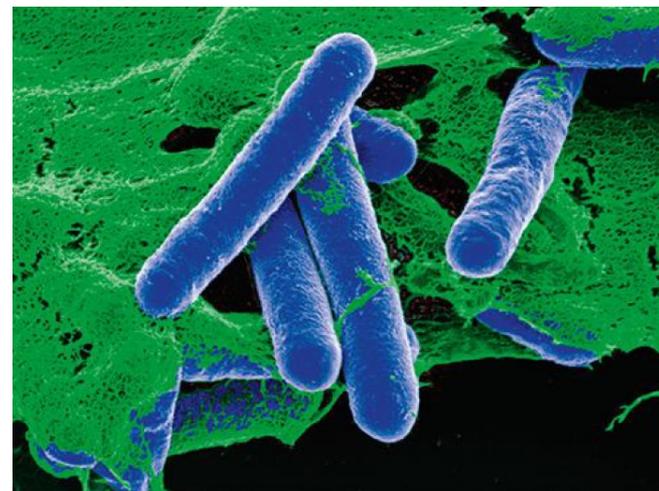


Immagine al microscopio elettronico di *Clostridium botulinum*.

Tossinfezione da *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens è un bacillo sporigeno anaerobio o microaerofilo.

Le sue spore si rinvencono nel suolo, nelle acque e nell'intestino di uomo e animali e possono contaminare gli alimenti.

I ceppi sono suddivisi in cinque gruppi in base alla produzione delle tossine α , β , ϵ , ι ; si tratta di enterotossine prodotte nel corso della sporulazione e termolabili.

La tossina provoca la formazione di canali nella membrana delle cellule intestinali, attraverso cui passano acqua e ioni.

La tossinfezione si manifesta con dolori addominali, febbre, vomito e diarrea acuta.

Infezione da batteri del genere *Bacillus*

Bacillus cereus è un batterio sporigeno aerobico facoltativo ad ampia diffusione ambientale: dal terreno contamina gli alimenti vegetali e, attraverso i mangimi, quelli di origine animale.

Le spore hanno un alto potere di adesività e possono permanere a lungo come biofilm negli impianti di produzione.

Le tossine hanno effetto diarroico (forti dolori addominali e diarrea) ed emetizzante (nausea e vomito).

Alcune specie possono rendersi responsabili di **tossinfezioni alimentari** con sintomatologia gastroenterica.

Tossinfezione da *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae è un batterio Gram negativo dalla caratteristica forma a virgola, aerobio/anaerobio facoltativo, che causa una grave tossinfezione: il **colera**, malattia endemica in alcuni Paesi sottosviluppati.

I vibrioni, eliminati con le feci dai portatori, trovano un ambiente favorevole alla loro riproduzione nelle acque. Assunti attraverso cibo e bevande arrivano all'intestino, dove elaborano la tossina colerica: enterotossina proteica termolabile che causa un'eccessiva produzione di AMP-ciclico, molecola che regola l'equilibrio idrosalino a livello intestinale.

Gravi conseguenze: massiccia disidratazione, collasso cardiocircolatorio, coma e morte.

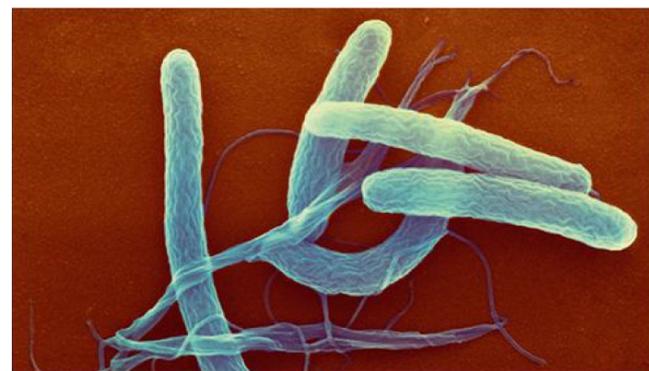


Immagine al microscopio elettronico di *Vibrio cholerae*.

Tossinfezione da *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes è un corto bacillo Gram positivo aerobio o anaerobio facoltativo appartenente al *phylum Firmicutes*, molto diffuso nell'ambiente e come ospite saprofita nell'intestino di uomo e animali.

È l'agente della **listeriosi**, che si manifesta in forma:

- invasiva: infezione sistemica che si diffonde attraverso l'apparato circolatorio e causa sepsi, meningiti, encefaliti, aborto e ha un tasso di letalità
- diarroica: sintomi tipici di una gastroenterite e decorso clinico di alcuni giorni

È ucciso dalla temperatura di pastorizzazione.

Infezioni da brucelle: la febbre maltese

Le **brucelle** sono coccobacilli Gram negativi aerobi.

Giungono con gli alimenti nell'intestino e da qui passano nel torrente circolatorio con episodi febbrili intermittenti.

I microrganismi si localizzano nel fegato, nella milza e nelle linfoghiandole, di cui provocano necrosi parenchimale.

La **brucellosi** si trasmette all'uomo attraverso l'ingestione di latte e latticini provenienti da animali infetti.

La malattia è anche chiamata **febbre maltese**, dal luogo dove si verificarono i primi casi e dove fu studiata, e **febbre ondulante** perché causa una febbre ricorrente.

Tossinfezione da *Campylobacter*

Campylobacter jejuni è un bacillo ricurvo Gram negativo asporigeno e microaerofilo; il suo aspetto ricorda quello dei vibrioni.

È una delle prime cause di tossinfezioni alimentari, responsabile soprattutto di episodi di gastroenterite in età infantile.

Vive come commensale nell'intestino di vari animali e viene eliminato con le feci. Produce diverse tossine.

È ucciso dalla pastorizzazione, per cui i casi di infezione derivano dal consumo di carne poco cotta, soprattutto di pollo o di maiale.

Infezioni alimentari da virus

I **virus** non trovano negli alimenti condizioni favorevoli al loro sviluppo, ma sono la più comune causa di malattie alimentari. Vengono trasmessi con gli alimenti attraverso il circuito orofecale, in seguito alla contaminazione di acqua e cibo con materiale fecale.

Rotavirus: responsabili di gastroenteriti soprattutto nei bambini.

Astrovirus: secondi nel causare gastroenteriti infantili.

Sono frequenti eventi di ricombinazione genetica, caratteristica che ne aumenta la variabilità e la pericolosità.

Virus dell'epatite A: dall'intestino raggiunge il tessuto epatico provocando una necrosi cellulare; attraverso il sangue, il virus può raggiungere altri organi.

Micotossicosi: le patologie causate da muffe

Micotossine: sostanze tossiche per l'essere umano e gli animali prodotte da muffe.

Sono sostanze eterogenee dal punto di vista chimico, prodotte soprattutto da muffe dei generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* e accomunate dal basso peso molecolare e dalla difficile eradicazione dai substrati in cui si sviluppano.

Le tossine più note sono:

- **Alfatossine** (sono le più pericolose per uomo e animali)
- **Ocratossine**
- **Deossinivalenolo e fumosine**

Tecniche analitiche colturali, immunologiche e molecolari /1

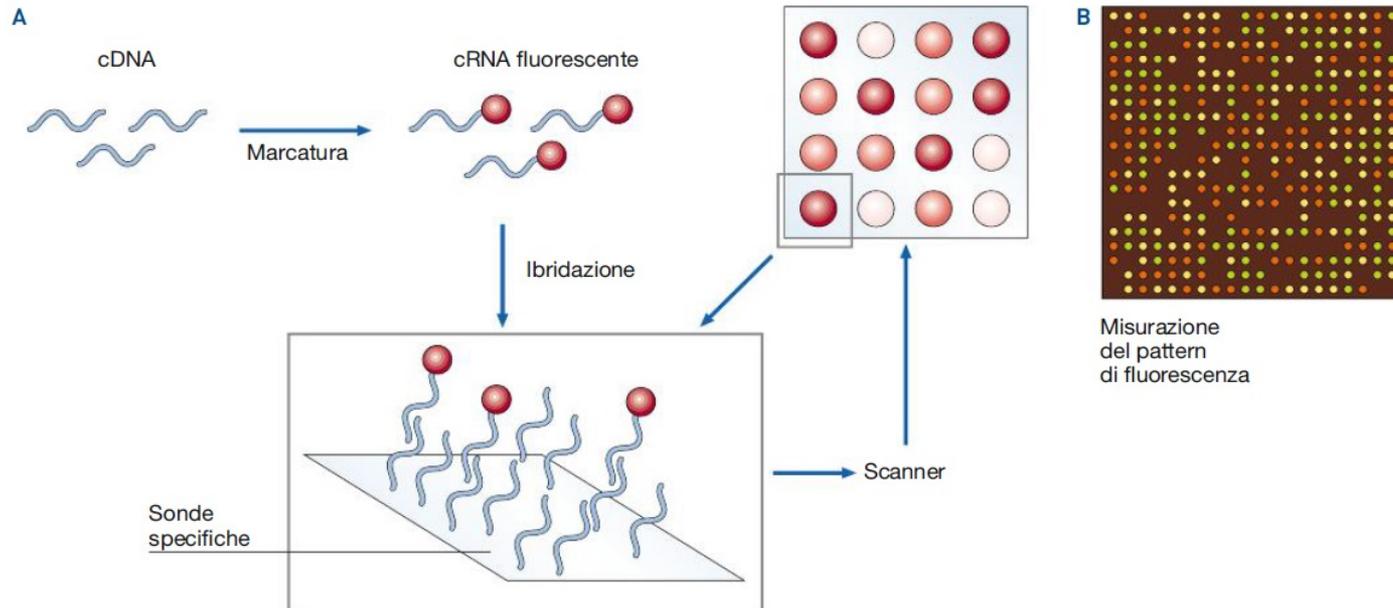
Il controllo microbiologico e chimico dei prodotti alimentari ha la massima importanza ai fini della salvaguardia della qualità igienico-sanitaria e della tutela della salute dei consumatori.

Si utilizzano tecniche differenti:

- tecniche immunologiche come **EIA** (*enzime immunoassay*) ed **ELISA** (*enzime-linked immunosorbent assay*): si basano sulla specificità di legame fra anticorpi monoclonali e antigeni microbici
- **tecniche immunomagnetiche** o IMS: impiegano particelle magnetiche ricoperte di anticorpi specifici per determinati antigeni di batteri. Si applica poi un campo magnetico che separa e porta in coltura solo i batteri legati a tali particelle

Tecniche analitiche colturali, immunologiche e molecolari /2

- **sonde a DNA o RNA:** individuano le sequenze geniche specifiche dei microrganismi ricercati, essendo a queste complementari. Con un **microarray** si possono fissare decine di migliaia di sequenze polinucleotidiche



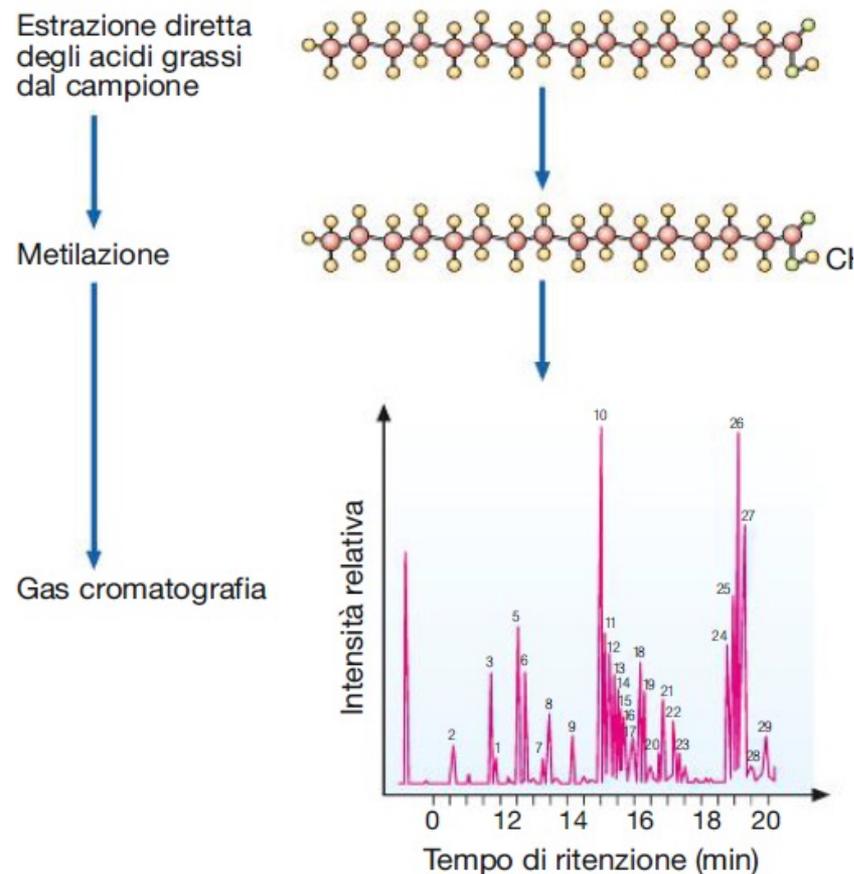
Microarray: (A) Schema della tecnica di ibridazione (A) e pattern di fluorescenza (B).

Tecniche analitiche colturali, immunologiche e molecolari /3

- **tecniche di amplificazione molecolare:** la reazione a catena della polimerasi (PCR) permette di amplificare una determinata sequenza nucleotidica presente anche in tracce minime, così da ottenerne una quantità sufficiente per poterla poi identificare con le altre tecniche
- **tecniche di bioluminescenza:** si basano sul dosaggio dell'ATP prodotta dai microrganismi, rivelata dalla reazione fra l'enzima luciferasi e lo specifico substrato (luciferina)
- **tecniche di impedanzometria:** i microrganismi producono metaboliti in grado di modificare l'impedenza o conduttanza del substrato in misura proporzionale al loro sviluppo

Tecniche analitiche colturali, immunologiche e molecolari /4

- analisi degli acidi grassi o **FAME** (*fatty acid methyl ester*):
si basa sulla separazione cromatografica degli esteri metilici degli acidi grassi dei singoli microrganismi



Schema della tecnica FAME.

I criteri microbiologici per il controllo degli alimenti

Un **criterio microbiologico** definisce l'accettabilità di un prodotto o di un processo produttivo, in base alla presenza o al numero di microrganismi e in base alla quantità delle relative tossine o metaboliti, per unità di massa, volume, area o partita.

- I **criteri di sicurezza alimentare** definiscono l'accettabilità di un prodotto alimentare immesso sul mercato nei confronti di un potenziale rischio biologico
- I **criteri di igiene di processo** definiscono il funzionamento accettabile del processo di produzione

I piani di campionamento per il controllo degli alimenti

Nei **piani di campionamento** è stabilito:

- il numero di campioni da analizzare: **unità campionarie (n)**
- il numero di unità campionarie sulle quali si può esprimere una **tolleranza (c)**
- il numero limite di microrganismi al di sotto del quale il risultato è soddisfacente (**m**)
- il limite massimo di accettabilità al di sopra del quale il risultato è insoddisfacente (**M**)

I piani di campionamento possono essere **a due o tre classi**:

- **due** se rivolto alla ricerca di patogeni (che devono essere assenti)
- **tre** quando si ricerca il numero di microrganismi presenti

I microrganismi indicatori della qualità degli alimenti /1

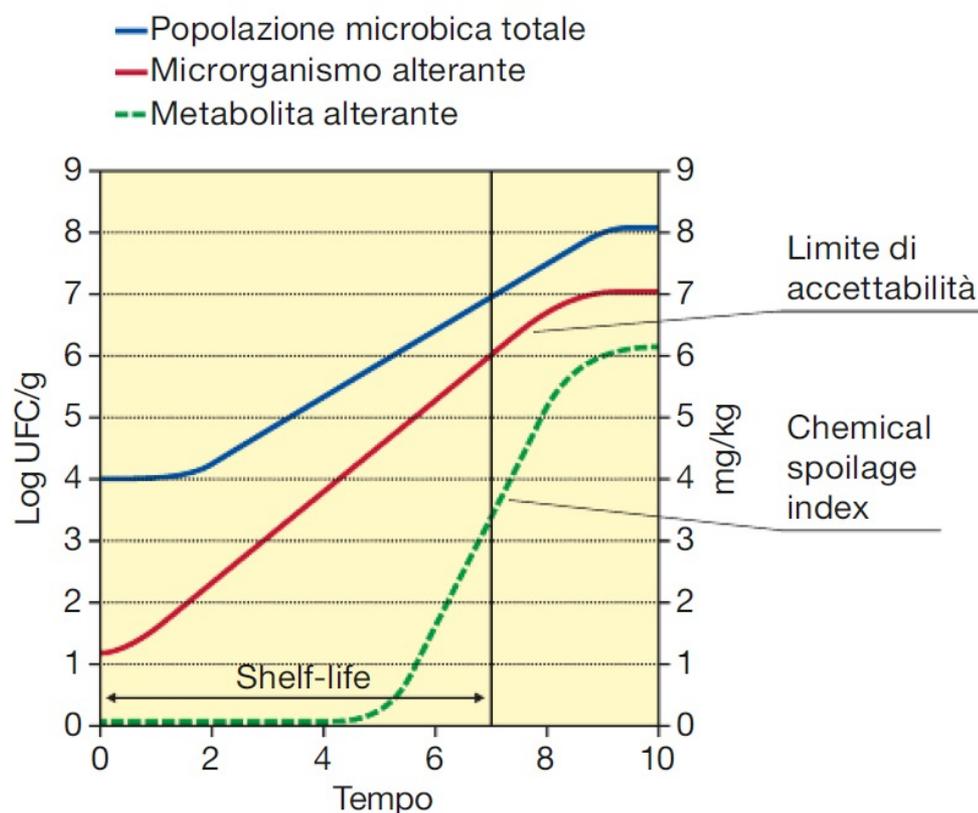
Per la valutazione della qualità microbiologica degli alimenti ci si può avvalere della ricerca di microrganismi:

- **indicatori di sicurezza:** microrganismi e relativi prodotti metabolici che possono rappresentare un pericolo per la salute del consumatore
- **indicatori di processo:** testimoniano una carenza di igiene in uno o più punti della filiera produttiva, dalla materia prima al prodotto finito
- **indicatori di qualità o *shelf-life*:** determinano la conservabilità del prodotto, perché ne condizionano le caratteristiche organolettiche di qualità

I microrganismi indicatori della qualità degli alimenti /2

Due parametri importanti:

- **limite di accettabilità:** la concentrazione minima di microrganismi che determina l'inaccettabilità dell'alimento
- **indice chimico di alterazione:** la concentrazione minima di metabolita che determina l'inaccettabilità dell'alimento



Andamento di alcuni parametri di alterazione microbica.

Il controllo microbiologico delle acque potabili

Il controllo microbiologico delle acque potabili si pone l'obiettivo di evitare la diffusione di malattie infettive sostenute da microrganismi patogeni, di cui deve essere garantita l'assenza.

Si può escludere ogni tipo di rischio ricorrendo alla ricerca dei **microrganismi indicatori di inquinamento fecale**, ritenuti batteri spia della possibile concomitante presenza di enterobatteri patogeni.

Esempi: coliformi, *Escherichia coli*, enterococchi fecali, spore di clostridi solfito-riduttori, *Pseudomonas aeruginosa*, stafilococchi patogeni.

Carni fresche, congelate e salate

La **contaminazione microbica** delle carni da macello dipende dalle condizioni di allevamento, dallo stato di salute dell'animale e dalle condizioni di lavorazione e conservazione delle carcasse. In aerobiosi prevalgono batteri come *Pseudomonas* e *Brochothrix*, in ambiente anaerobico *Lactobacillus*.

- L'**ambiente refrigerato** blocca la proliferazione microbica, impedendo lo sviluppo di germi mesofili, ma non di psicrofili
- Con la **congelazione** si raggiungono temperature di -40°C e quasi nessun microrganismo è in grado di moltiplicarsi a temperature così basse
- Nelle carni salate il **sale** determina un ambiente osmoticamente sfavorevole alla sopravvivenza dei microrganismi

Conserve e semiconserve dei prodotti in scatola

- **Semiconserve:** prodotti in scatola sottoposti a trattamento termico moderato ($<100^{\circ}\text{C}$) che non uccide tutti i microrganismi, ma elimina soprattutto i patogeni.
- **Conserve:** prodotti in scatola sottoposti a trattamento termico a temperatura elevata ($>100^{\circ}\text{C}$).

Possibili microrganismi:

- conserve vegetali: microrganismi di provenienza ambientale (es. *Bacillus*), oltre a muffe, protozoi e alghe
- conserve animali: batteri intestinali (es. batteri lattici)
- contaminazione durante la lavorazione delle materie prime, soprattutto a opera di enterobatteri, stafilococchi e *Bacillus*.

Salumi

Le caratteristiche microbiologiche degli **insaccati freschi** riflettono quelle delle materie prime e dell'ambiente di lavoro: i microrganismi presenti in questi prodotti sono soprattutto coliformi, micrococchi, *Pseudomonas*, clostridi, lieviti e muffe.

Negli **insaccati stagionati** l'alimento subisce importanti modifiche di carattere fisico, biochimico e microbiologico: lattobacilli e micrococchi sono la componente microbica preponderante al termine del periodo di stagionatura.

Latte

Il **latte** contiene: acqua, zuccheri (disaccaride lattosio = glucosio + galattosio) in soluzione acquosa con sali minerali e vitamine, proteine (caseina, lattoalbumina e lattoglobulina) allo stato colloidale e lipidi emulsionati.

Lasciato a sé va incontro a una massiccia proliferazione microbica che in un paio di giorni lo rende inutilizzabile.

I **microrganismi** possono provenire:

- dalla mammella delle femmine lattifere in seguito a mastite
- dall'ambiente d'allevamento e da operazioni di mungitura igienicamente scorrette

Si possono trovare: microrganismi psicrofili, acidificanti, lieviti e muffe.

Uova

Le **uova** sono ricche di proteine, aminoacidi essenziali, lecitine, vitamine, calcio, ferro e fosforo.

Sono costituite da **tuorlo** (cellula uovo, costituita pressoché totalmente dal citoplasma), **albume** (soprattutto proteina ovoalbumina) e **guscio** (riserva di calcio e barriera protettiva).

La **contaminazione microbica** delle uova può verificarsi prima della deposizione da parte di microrganismi che infettano la gallina o per successivi contatti con l'ambiente esterno.

I microrganismi più spesso evidenziabili sono *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Campylobacter* e stafilococchi coagulasi positivi.

Prodotti ittici

In **pesci**, **molluschi** e **crostacei** i fenomeni degradativi e di alterazione si verificano molto più velocemente rispetto ad altri alimenti, probabilmente per la composizione chimica e il pH poco acido dei tessuti.

I **molluschi bivalvi** (cozze, ostriche, vongole) sono organismi microfiltratori e quindi trattengono e concentrano i microrganismi che si trovano nelle acque in cui vivono.

Si possono commercializzare solo a seguito di un trattamento di stabulazione in acque controllate per un periodo prestabilito di risanamento e depurazione.

I **germi** che si rinvencono più di frequente sono *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Clostridium*, enterobatteri e vibrioni, oltre a lieviti e muffe.