

Microbiologia degli alimenti

- **La microbiologia degli alimenti studia**
 - ✓ la provenienza
 - ✓ il significato

delle varie specie microbiche presenti nell'alimento

- **Il comportamento dei microrganismi durante i processi tecnologici**
- **L'influenza dei microrganismi durante la conservazione degli alimenti**

Il controllo microbiologico degli alimenti:

➤ FONTI DI CONTAMINAZIONE

- ✓ Valuta il rispetto o meno delle norme igieniche di lavorazione e conservazione per la presenza od assenza di particolare gruppi microbici**
- ✓ Valuta le condizioni di conservazione del prodotto e pertanto stabilisce la durata del periodo di conservazione**
- Segue l'esatto susseguirsi di certi PROCESSI FERMENTATIVI indispensabili per la produzione di particolari alimenti (latte fermentati, prodotti di salumeria ecc.) ed eventualmente li corregge**

➤ SICUREZZA ALIMENTARE:

- ✓ Elimina dal commercio tutti quei prodotti contaminati da germi patogeni, o loro tossine nocive per l'uomo**

Limiti del controllo microbiologico

- Distribuzione non omogenea dei batteri patogeni nella massa del prodotto o nei singoli componenti del lotto produttivo
- Presenza di cariche bassissime di patogeni, caratterizzati da particolare virulenza, i quali possono sfuggire alla ricerca analitica (*Shigella*)
- Presenza di patogeni non batterici, dai virus ai protozoi e a gli elminti

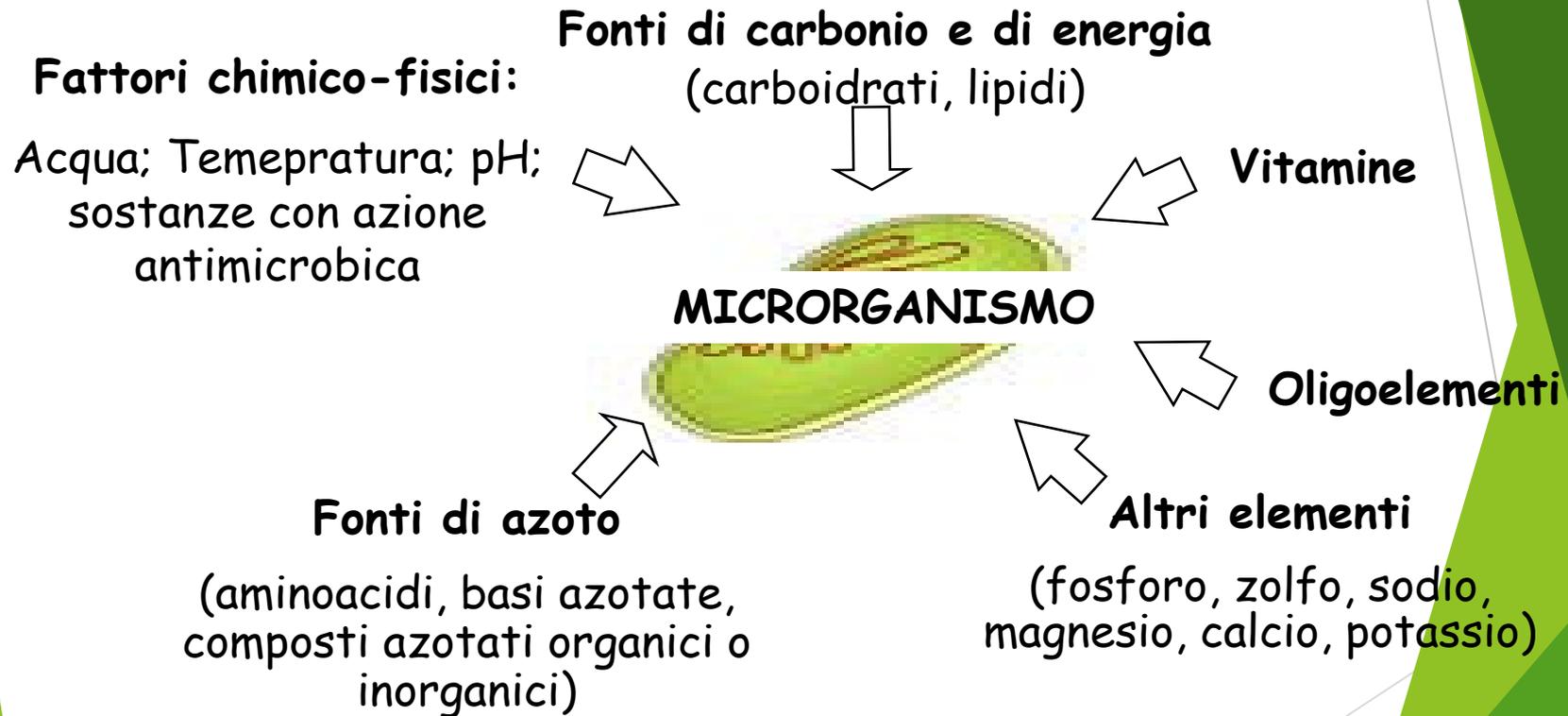
**“La chiave del controllo microbiologico della sicurezza igienica così come della proliferazione microbica negli alimenti sta nella conoscenza ed applicazione dei principi dell’ecologia microbica”
(Mossel, 1983)**

ECOLOGIA MICROBICA

Scienza delle relazioni tra microbi ed il loro ambiente, che determinano la loro crescita, la sopravvivenza o la morte.

Fattori che influenzano lo sviluppo microbico

La presenza e la moltiplicazione microbica negli alimenti e bevande sono determinate dalle condizioni ambientali lungo tutto il processo produttivo



Temperatura



Influenza direttamente la velocità delle reazioni biochimiche del metabolismo e determina lo stato fisico del mezzo in cui i microrganismi sono presenti

↘ Condiziona **SICUREZZA, ACCETTABILITA'** e **DURATA** del **PRODOTTO**

Ogni forma microbica presenta un minimo e un massimo di temperatura alla quale può avvenire la proliferazione cellulare e un *optimum* al quale si ha la massima velocità di proliferazione

	minimo	optimum	massimo
<i>Psicrofili</i>	-5/+5°C	10/15°C	20/25°C
<i>Mesofili</i>	5/15°C	30/45°C	35/45°C
<i>Psicrotrofi</i>	-5/+5°C	20/30°C	30/35°C
<i>Termotrofi</i>	5/15°C	35/45°C	55/60°C
<i>Termofili</i>	40/45°C	55/75°C	65/90°C

Temperatura

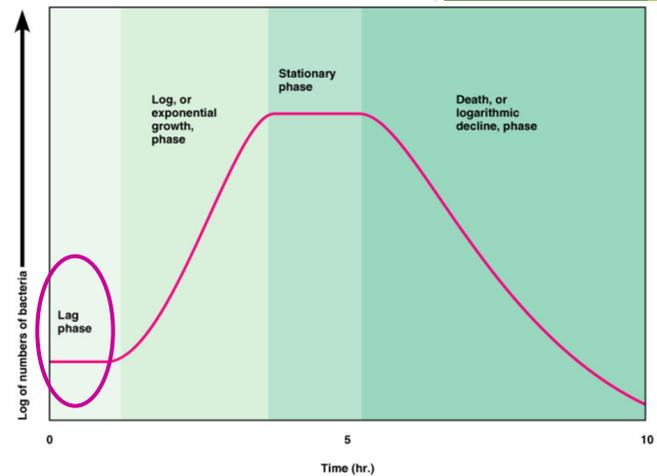
Condiziona l'andamento della proliferazione microbica poiché influenza:

● durata della fase di latenza;

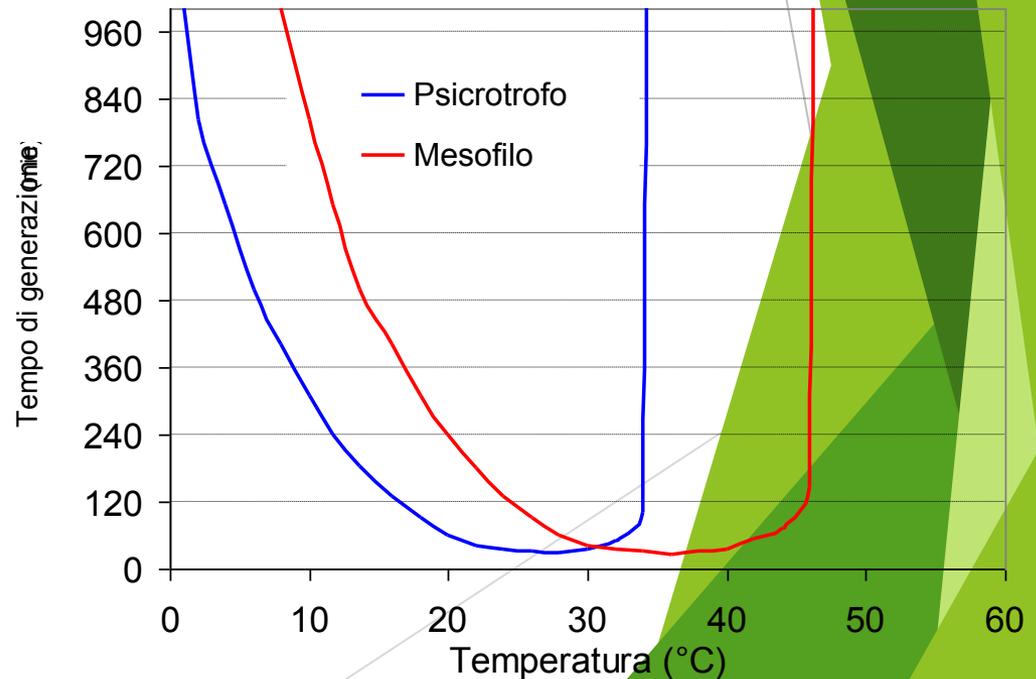
● tempo di generazione;

● numero finale di cellule;

● attività metaboliche (produzione di esoenzimi, composizione in acidi grassi delle membrane cellulari, richieste nutrizionali).



Effetto della temperatura sul tempo di generazione



Alterazioni della temperatura per preservare i cibi

Basse temperature

Refrigerazione

Congelamento

Surgelamento

Alte temperature

Pastorizzazione

Cottura

Sterilizzazione

Abbattere il più possibile la carica microbica contaminante

Psicrotrofi: microrganismi che crescono a temperature di refrigerazione

Psicrotrofi in latte pastorizzato: *Bacillus*,
Enterococcus

Psicrotrofi in burro e formaggi freschi: *Pseudomonadaceae*

Psicrotrofi in carne fresca: *Pseudomonadaceae*
Psicrotrofi in carne fresca confezionata in atmosfera protettiva:
Enterobacteriaceae,
Enterococcus

Psicrotrofi in pesce fresco: *Pseudomonadaceae*,
Vibrionaceae

Psicrotrofi in ortaggi freschi: *Pseudomonadaceae*

Refrigerazione e congelamento

REFRIGERAZIONE

Abbassamento della temperatura tra 0 e +6° (effetto batteriostatico). L'effetto dipende dal tipo di microrganismo e dal tempo di permanenza.

CONGELAMENTO

Abbassamento della temperatura al di sotto di 0°C fino a -40°C (batteriostatico e battericida). L'effetto finale dipende dallo stato vitale della cellula, dalla velocità di raffreddamento, dal tipo di matrice alimentare.

SURGELAMENTO

Congelamento rapido (-18°C entro 4h e mantenimento a -18°C fino alla vendita).

Refrigerazione e congelamento

Batteri **insensibili al congelamento** (spore batteriche, tossine, enzimi)

Batteri **relativamente resistenti** (spore di eumiceti, Gram +, virus)

Batteri **molto sensibili** (Gram -, eumiceti, protozoi ed elminti)

SCONGELAMENTO

processo critico per il rischio di proliferazione microbica a causa dell'**aumento del tenore in acqua e nutrienti disponibili** (fuoriuscita di materiale citoplasmatico dalle cellule)



Pastorizzazione, cottura, sterilizzazione

Blocco attività metaboliche → Danneggiamento REVERSIBILE ↓

Denaturazione acidi nucleici, coagulazione proteine funzionali,
denaturazione delle membrane → Danneggiamento IRREVERSIBILE ↓

Morte della cellula

Variabili:

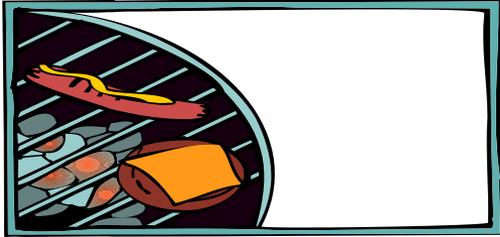
tipo di parete, formazione di spore, età della cellula, tipo di calore (umido o secco), pH, composizione sostanza alimentare, attività dell'acqua.

PASTORIZAZIONE

- **Distruzione** dei microrganismi patogeni non sporigeni e della gran parte della microflora saprofitica (90-99,9%).
- I microrganismi che resistono al trattamento sono detti **TERMODURICI**



COTTURA



- Bollitura, frittura, cottura in forno, cottura alla griglia, microonde.
- Trattamento intermedio tra pastorizzazione e sterilizzazione.
- Le uniche forme microbiche sopravvivenenti sono le **spore batteriche**.

STERILIZZAZIONE

- **Distruzione completa** dei microrganismi presenti.
- La sterilità assoluta non esiste. Si ottiene una **sterilità commerciale** (abbassamento di 12 riduzioni decimali di spore di *Clostridium botulinum*).



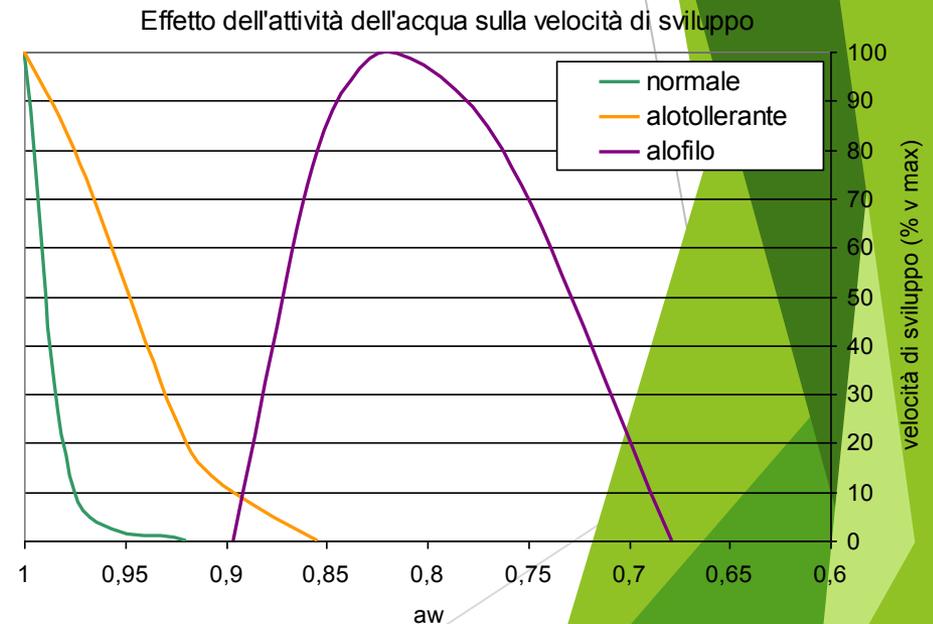
I prodotti alimentari sottoposti a sterilizzazione sono detti **CONSERVE**.
Necessitano di refrigerazione solo dopo l'apertura della confezione.

Attività dell'acqua

a_w = frazione di acqua non legata chimicamente (acqua libera) e quindi disponibile per lo sviluppo microbico.

$$a_w = \frac{P}{P_o}$$

Ogni microrganismo ha un **valore minimo di a_w** al di sotto del quale non si sviluppa e un **valore ottimale** dove è massima la velocità di duplicazione. La diminuzione di a_w ha effetto principalmente batteriostatico. Numerosi processi di conservazione si fondano sull'**abbassamento dell' a_w** .



Valori di aw

1-0,98



Alimenti freschi (ortaggi, frutta, carni, pesce), acqua e bevande analcoliche o poco alcoliche, pietanze cotte in bollitura o in frittura, impasti, creme di condimento

0,98-0,93



Latte evaporato, formaggi freschi e a media stagionatura, formaggi fusi, conserve di carne e di pesce, insaccati freschi o poco stagionati, carne salata (NaCl <10%), pasta fresca, frutta allo sciroppo

0,93-0,85



Salumi stagionati, formaggi a lunga stagionatura, latte condensato, pane e prodotti da forno lievitati dopo cottura

0,85-0,60

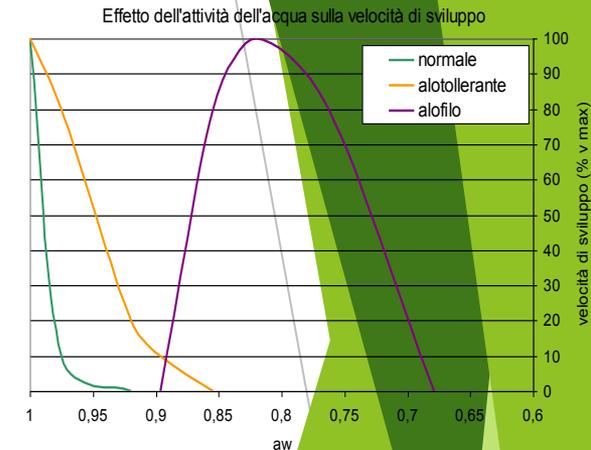


Frutta secca, farina, cereali in semi, miele, marmellate e gelatine, semi oleaginosi, pesci e carni fortemente salati, estratto di carne

< 0,60

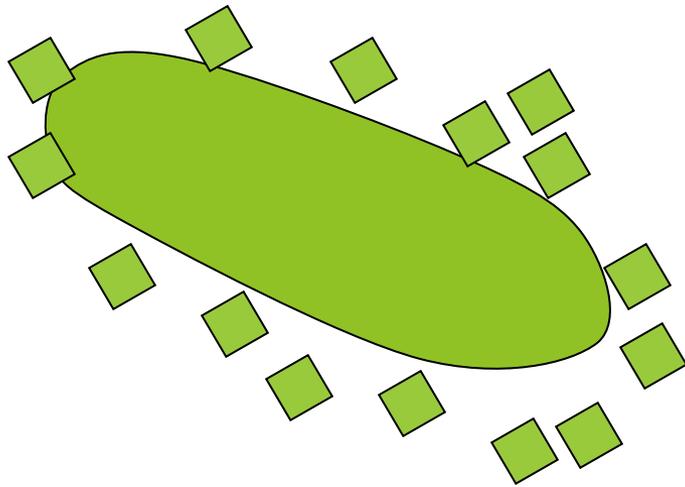


Alimenti in polvere disidratati ed essiccati, cioccolato, caramelle dure, biscotti secchi, crackers, pasta secca



Il sale

- Plasmolisi
- Inibizione attività enzimatiche



ALOFILI (*Halobacterium*, *Halococcus*) necessitano per sopravvivere una presenza di sale pari almeno al 20%

ALOTOLLERANTI (*Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, alcuni *Bacillus*, *Vibrio*, alcuni lieviti) riescono a moltiplicarsi fino al 15%

pH e ACIDITA'

Concentrazione degli ioni idrogeno in fase acquosa.

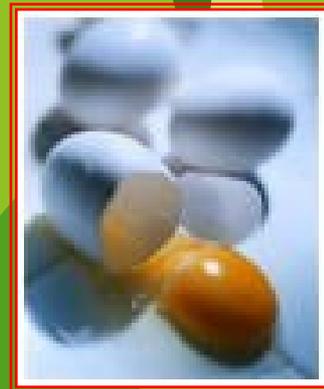
In generale i patogeni vengono inibiti da valori di pH che si discostano dalla neutralità, in modo maggiore verso il campo acido

pH = 4,5 → livello di sicurezza per gli indicatori di salubrità.



Lieviti, muffe, batteri lattici, batteri acetici possono moltiplicarsi a pH < 3,5

Muffe, *Pseudomonadaceae*, vibrioni ed enterococchi proliferano anche a pH > 9,0



Valori limite di pH per la moltiplicazione di alcuni microrganismi

Specie o gruppo	pH minimo	pH massimo
Muffe	2,0	11,0
Lieviti	2,0	9,0
Batteri acetici	3,0	9,0
Lattobacilli	3,3	8,5
Enterococchi	3,5	9,6
Lattococchi	4,0	8,0
Micrococchi	4,0	9,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,0	9,3
<i>Salmonella</i> spp.	4,0	9,6
<i>Bacillus cereus</i>	4,4	9,3
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4,5	9,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	4,6	9,3
<i>Escherichia coli</i>	4,6	9,0
<i>Clostridium botulinum</i>	4,6	8,5
Pseudomonadaceae	4,6	9,6
Enterobacteriaceae	4,6	9,0
Vibrionaceae	4,6	9,6
<i>Clostridium perfringens</i>	5,0	9,0
<i>Campylobacter jejuni</i>	6,0	9,6



pH acido **pH basico**

- | | |
|--|---|
| <p>3 Acqua e bevande gassate, drink energetici, selz.</p> <p>4 Aceto, aspartame, birra, carne di maiale, cioccolato, formaggi, nocciole tostate, pasta, pizza, popcorn, sottaceti, tè nero, vino.</p> <p>5 Acqua depurata e distillata, arachidi, caffè, carne di manzo, farinacei, pane bianco, pistacchi, succhi di frutta industriali.</p> <p>6 Fagioli, fegato, cacao, latte di soia, pesce, prugne, riso, salmone, spinaci cotti, ostriche, uova.</p> | <p>7 pH Neutro Acque minerali, acque di fiume e di mare, acque anche non potabili.</p> <p>8 Ananas, albicocche, banane, ciliegie, fragole, funghi, mandorle, mele, olive, peperoni, pesche, pompelmi, pomodori, ravanelli.</p> <p>9 Fagiolini, fichi, kiwi, lattuga, mandarini, melanzane, meloni, mirtilli, papaia, patate, pere, tè verde, uva.</p> <p>10 Asparagi, alghe, broccoli, carciofi, carote, cavoletti Bruxelles, cavolo verza, cavolfiore, cetrioli, cipolle, limoni.</p> |
|--|---|

Atmosfera modificata

L'utilizzo di **gas** può essere efficace per la conservazione di alimenti confezionati al fine di inibire o rallentare la microflora di tipo alterativo

Alimenti **CONFEZIONATI** per inibire o rallentare la microflora

- a) **SOTTOVUOTO** aria eliminata per aspirazione
- b) **ATMOSFERA PROTETTIVA**
atmosfera riprodotta a seguito di re-iniezione di gas
- c) **ATMOSFERA CONTROLLATA**
composizione e/o pressione dell'atmosfera mantenuta costante in un ambiente confinato



Additivi chimici

Sostanze prive di potere nutritivo o impiegate a scopo non nutritivo che si aggiungono alla matrice alimentare per conservarne nel tempo le **caratteristiche chimiche, fisiche o fisico-chimiche**, o per evitare l'alterazione spontanea o per dare o esaltare caratteristiche di aspetto, sapore, odore o consistenza



Coloranti (E100-E199)

Conservanti (E200-E299) → Sostanze antimicrobiche

Antiossidanti (E300-E322)

Correttori di acidità (E325-E385)

Addensanti, emulsionanti e stabilizzanti (E400-

Fattori di tipo biologico

MUTUALISMO →

I microrganismi traggono reciproco vantaggio dal rapporto

COMMENSALISMO →

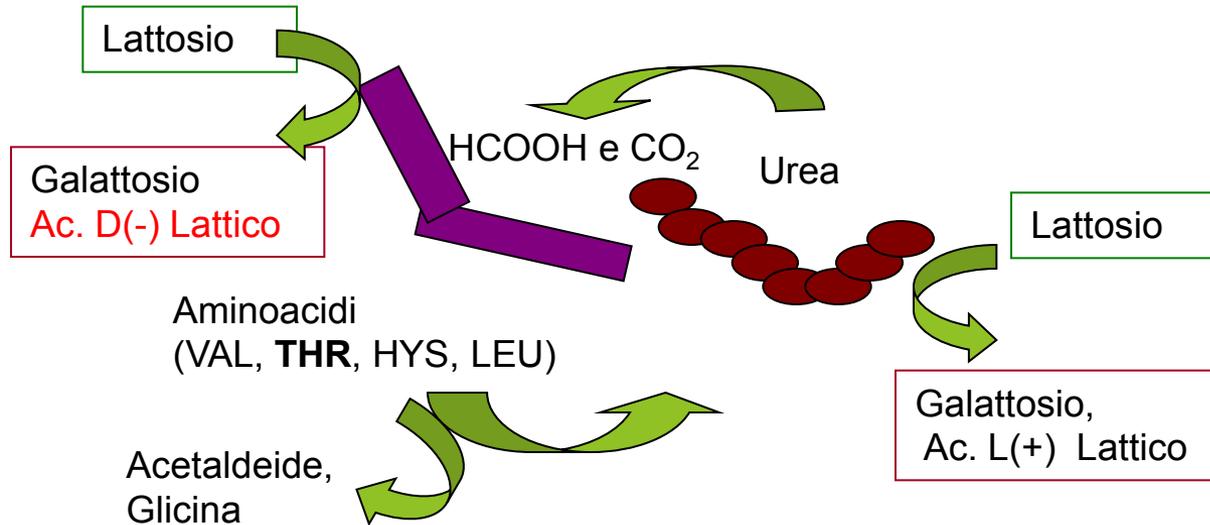
I microrganismi sono indifferenti alla reciproca presenza

ANTAGONISMO →

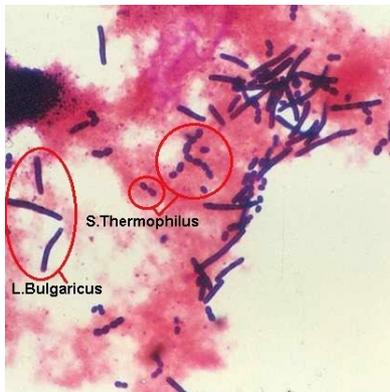
I microrganismi traggono svantaggio dal rapporto

MUTUALISMO

Fermentazione omolattica



Lactobacillus bulgaricus e *Streptococcus thermophilus*



Batteri lattici che in assenza di ossigeno degradano il lattosio in il glucosio e poi in acido lattico
→ **Abbassamento pH** e **precipitazione caseine**
→ **Coagulazione proteine del latte e formazione yogurt**



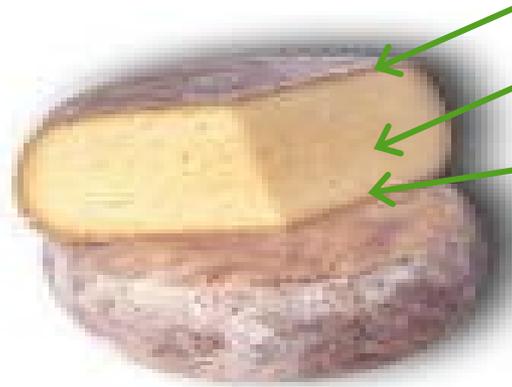
COMMENSALISMO

Microflora del
latte crudo

Microflora
dei formaggi

Microflora
della carne
fresca

Microflora del
salame



muffe, lieviti, batteri aerobi

batteri lattici, enterococchi

batteri propionici

Nei formaggi di tipo svizzero
usano l'acido lattico prodotto
dai batteri lattici.



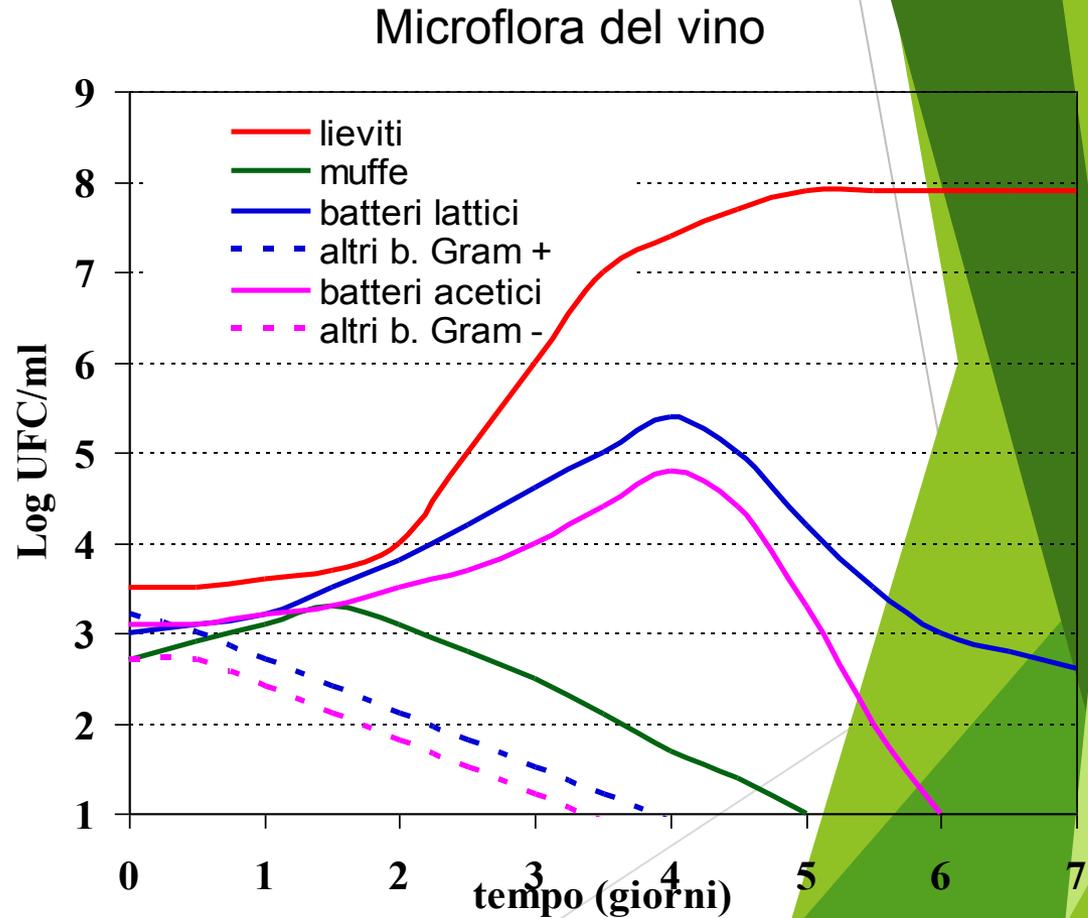
muffe, lieviti, micrococchi

stafilococchi, lattobacilli

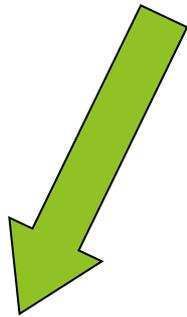
ANTAGONISMO

Una specie microbica risulta dannosa per un'altra

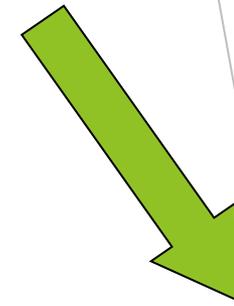
Microflora del mosto
diventa vino che



Microorganismi e alimenti



Contaminazione microbica



Alimenti fermentati



Contaminazione microbica degli alimenti

CONTAMINAZIONE DEGLI ALIMENTI

I microrganismi presenti negli alimenti sono il risultato di una contaminazione

CONTAMINAZIONE PRIMARIA

→ Dovuta a microrganismi presenti naturalmente nell'alimento

CONTAMINAZIONE SECONDARIA

→ Dovuta a microrganismi apportati dall'ambiente esterno e dagli operatori durante il processo di trasformazione, conservazione, distribuzione

Aria polvere, umidità, aerosol

Suolo terra, materiale fecale, sporco

Acqua ambiente ricco di esseri viventi e di microrganismi



CONTAMINAZIONE DEGLI ALIMENTI

Vegetali

microrganismi fitopatogeni (in grado di determinare malattie alla pianta) e **microrganismi saprofiti** (finché la pianta è integra)



Animali

microrganismi zoopatogeni (in grado di determinare malattie negli animali) e **microrganismi saprofiti** della pelle, delle mucose e dell'apparato gastro-intestinale, spoglie, deiezioni (materiale fecale, peli, piume)



Superfici di lavorazione/conservazione/ distribuzione

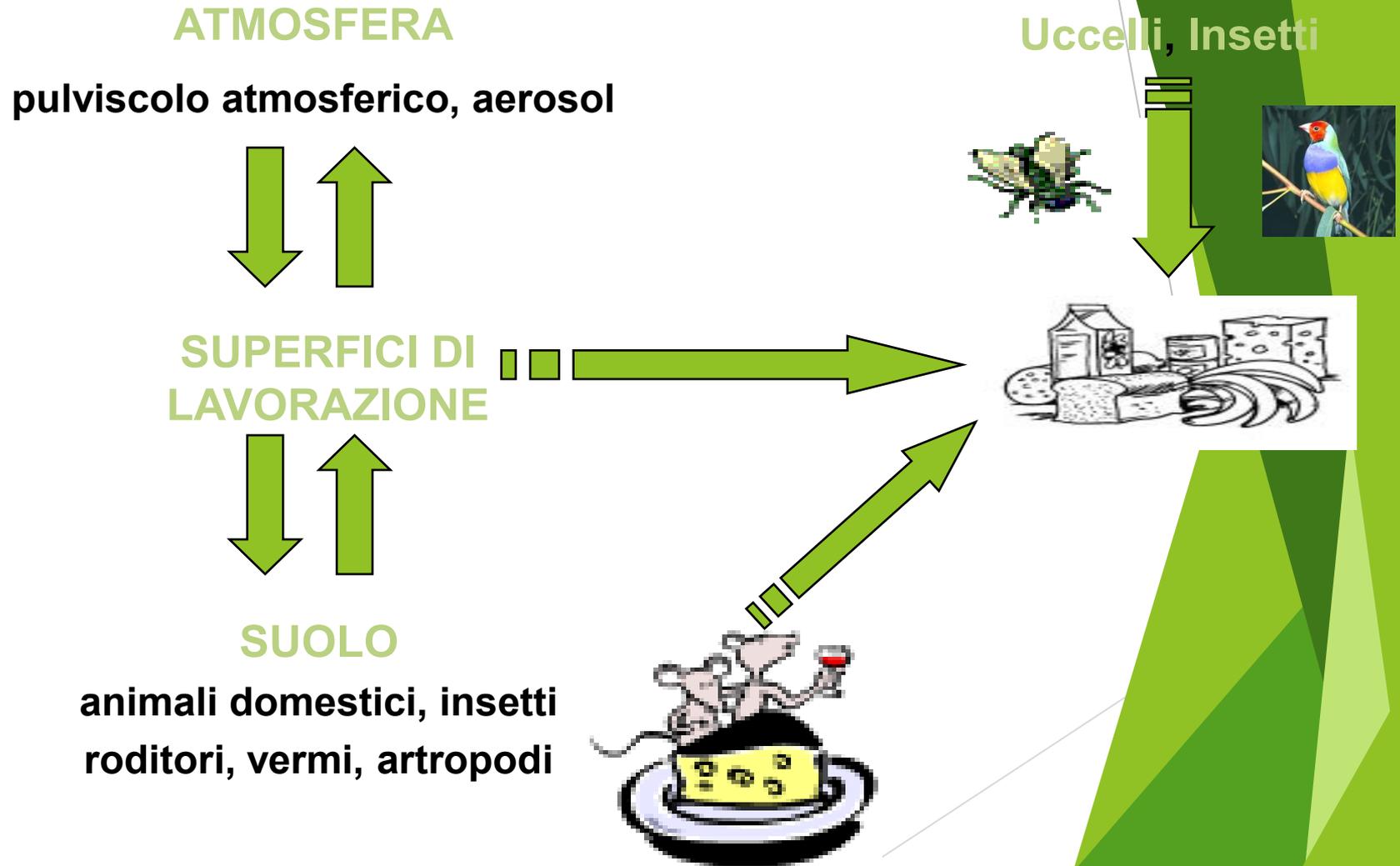
(macchine dell'impianto, attrezzature, utensili e strumenti, tavoli di lavoro, superfici di stoccaggio, stoviglie)



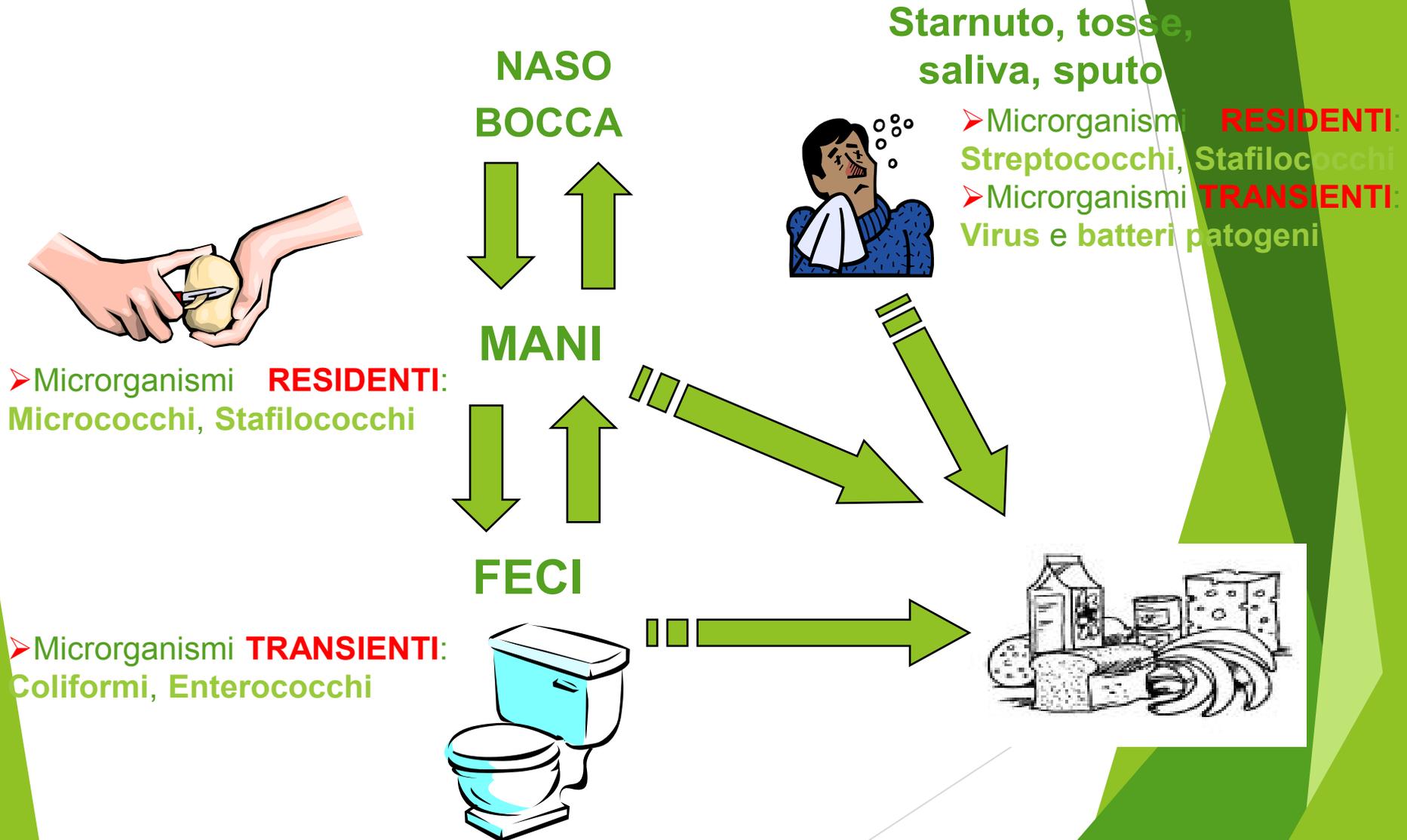
Uomo

Manipolazione

Fonti di contaminazione in produzione



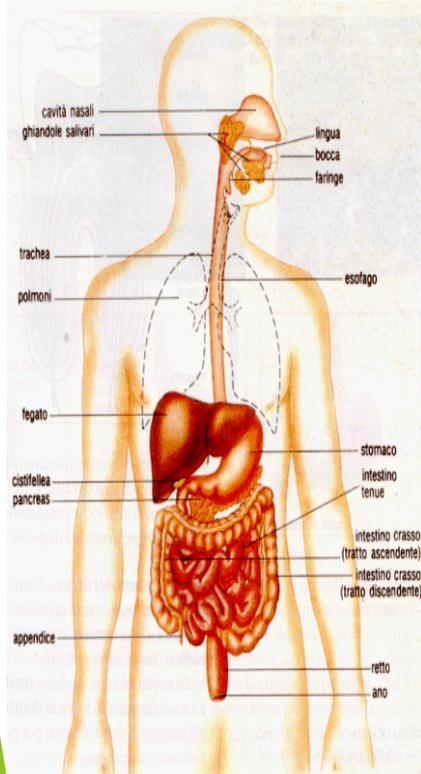
Fonti di contaminazione umana



Fonti di contaminazione umana

APPARATO DIGERENTE

La concentrazione batterica è elevatissima a livello di intestino crasso e di conseguenza nelle feci.



Parte anatomica	Genere batterico	Livelli di concentrazione nel contenuto (UFC/g)
Bocca	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Staphylococcus</i>	10^5-10^7
Esofago		$< 10^3$
Stomaco		$< 10^3$
Duodeno		$< 10^3$
Digiuno		10^3-10^5
Ileo	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>	10^5-10^7
Colon, Retto	<i>Bacteroides</i> <i>Eubacterium</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Clostridium</i> <i>Peptococcus</i> <i>Escherichia</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Enterococcus</i>	$10^{10}-10^{12}$ 10^8-10^{10}

Igiene del personale

- Gli operatori che vengono a contatto con gli alimenti deve sottostare ad una cura particolare dell'igiene personale e dell'abbigliamento.
- Le **mani** sono un mezzo importante di distribuzione di microrganismi: affinché questa trasmissione sia minima bisogna provvedere ad un adeguato lavaggio con saponi battericidi; i normali saponi, soprattutto quelli liquidi, se mal conservati possono contaminarsi.



CAMPIONAMENTO

Raccolta di materiale su cui eseguire l'analisi microbiologica



CAMPIONE RAPPRESENTATIVO

Su cui verranno effettuate
analisi microbiologiche per
verificare che rispetti
determinati **criteri
microbiologici (STANDARD
O LINEE GUIDA)**



**Limiti della presenza o assenza di microrganismi o loro
tossine negli alimenti**

In funzione del ruolo, i microrganismi che contaminano gli alimenti possono essere suddivisi in:

**Indicatori di tipicità
o protecnologici**

Naturalmente presenti

Selezionati in laboratorio

Indicatori di qualità

Indicatori di salubrità

Indicatori di qualità

Indicano con il loro numero espresso per grammo o per millilitro (UFC/g o ml) le caratteristiche di **pulizia ed igiene delle tecniche di manipolazione e conservazione** che il prodotto ha subito.

Il valore caratterizza la **conservabilità** fino al momento del consumo.

Marker di igiene sono:

- o ***E.coli*** → Contaminazione fecale
- o **Clostridi solfito-riduttori** → Contaminazione fecale
- o ***S. aureus*** → Contaminazione umana
- o **Muffe** → Contaminazione ambientale

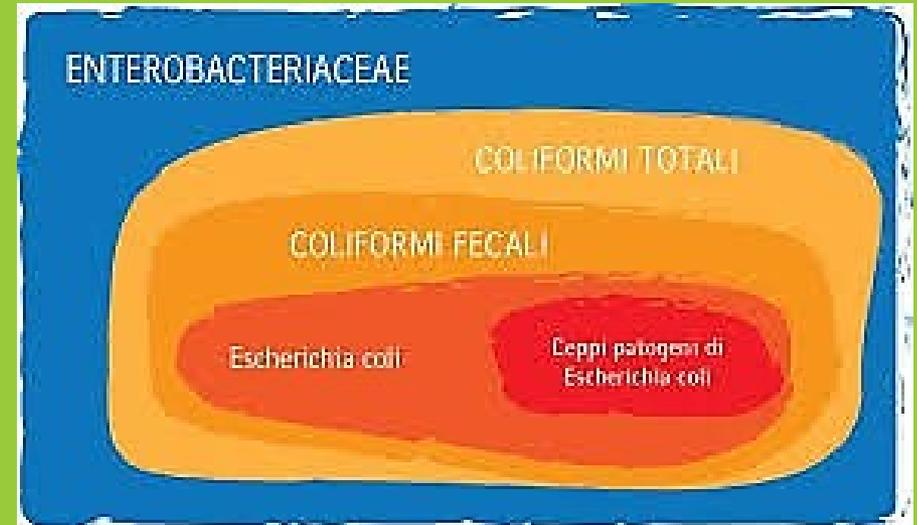


Marcatori di igiene	Prodotto	Gruppo o specie microbica
Indice di contaminazione fecale	Tutti gli alimenti	<i>E. coli</i>
	Acque per il consumo umano	Coliformi, <i>E. coli</i> , enterococchi, <i>C. perfringens</i>
Germi testimoni di carenza di igiene	Latte e prodotti lattiero-caseari	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
	Carne e derivati	Coliformi fecali, <i>C. perfringens</i> , <i>Listeria spp.</i>
Indice di contaminazione umana da manipolazione	Tutti gli alimenti	<i>S. aureus</i>
Muffe tossinogene	Latte in polvere, cereali, farine e sfarinati, legumi, cacao, caffè, spezie, semi oleaginosi, alimenti a ridotta Aw, puree e preparati a base di frutta	<i>Aspergillus spp.</i>
Batteri tossinfettivi	Puree e preparati a base di verdure, piatti pronti di gastronomia, prodotti di salumeria, preparazioni a base di carne cotta, alimenti non acidi condizionati in assenza di aria	Clostridi solfito-riduttori

I batteri coliformi: *Enterobacteriaceae*

Coliformi totali:

Citrobacter,
Enterobacter,
Escherichia,
Klebsiella,
Serratia (alcune specie)



Coliformi fecali, o termotolleranti, o termotrofi

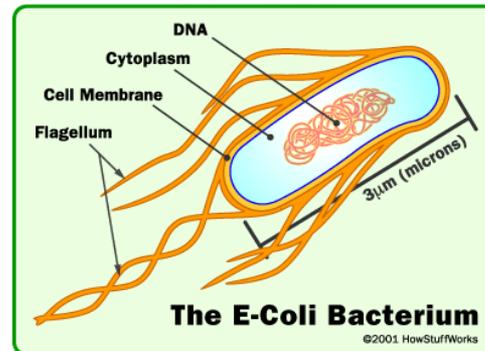
Enterobacter (alcune specie),
Klebsiella (alcune specie)

Escherichia coli

Escherichia coli

E. coli è un ospite normale del tratto GI di uomo ed animali, per cui la sua presenza in acqua indica contaminazione fecale.
Ha molti diversi antigeni O, H, K, e specifici sierotipi sono associati ad aumentata virulenza

Possiede numerosi fattori di virulenza, fra cui **ADESINE** altamente specializzate ed **ESOTOSSINE**



Moltissimi E. coli sono presenti nel tratto gastroenterico, e le infezioni possono essere sia endogene che esogene (gastroenteriti, meningite neonatale). Di solito, le malattie da E. coli derivano dalla flora normale quando le difese sono compromesse. Ci sono ceppi (EIEC, ETEC, ecc) particolarmente patogeni

ETEC (enterotossico): è la più importante causa batterica di diarrea in bambini nei paesi in via di sviluppo, e la causa più comune della “diarrea del viaggiatore”. **Trasmesso per via alimentare.**

Ha fattori di colonizzazione (pili), che si legano a specifici recettori sulla membrana delle cellule intestinali e produce **due potenti enterotossine**, codificate da plasmidi:

LT labile al calore (simile alla tossina colerica, e può essere scambiato per colera in bambini denutriti): aumenta cAMP. Con secrezione di ioni e diffusione di acqua. Induce citochine proinfiammatorie

ST stabile al calore, aumenta cGMP, con effetti simili a LT.

Diagnosi di laboratorio: isolamento da feci, ELISA per rivelazione delle tossine, ibridazione con sonde molecolari per i geni LT e ST.

EIEC Enteroinvasivi: solo pochi sierotipi O causano dissenteria (feci con sangue e pus) con febbre, crampi addominali, localizzati soprattutto all'intestino crasso. **Spesso infezione alimentare.** Il fattore di adesione e di invasività è codificato da un plasmide. Dopo l'endocitosi, EIEC lisa il vacuolo endocitico, diffonde alle cellule adiacenti, causando distruzione tissutale e infiammazione.

Sono disponibili saggi immunologici e sonde molecolari, ma spesso di scarsa utilità perché il grande plasmide che codifica i fattori di virulenza in vitro viene perso rapidamente

EPEC enteropatogeno, causa diarrea acquosa in neonati in paesi poveri, distrugge i microvilli.

Diagnosi mediante sierotipizzazione con antisiero polivalente per i tipi EPEC conosciuti.

EHEC enteroemorragico O157:H7 è il sierotipo più importante. Inizialmente diarrea acquosa, seguita da diarrea con sangue (colite emorragica) con crampi e vomito. Infez. alimentare (carni poco cotte, acqua, latte non pastorizzato, verdura cruda, frutta. Bassa dose infettante (100 batteri) Incubazione 3-4 giorni, malattia 4-10 giorni. Complicazione frequente sindrome uremica emolitica (blocco renale, trombocitopenia, anemia emolitica), con mortalità 5% e danni permanenti. Produce **due tossine (Shiga)**, che impediscono la sintesi proteica.

EHEC nei campioni fecali può essere scarsamente presente, <1% di tutte le colonie di E.coli, di solito non fermenta il sobitolo.



SMAC (Sorbitol MacConkey) differenzia efficacemente i sierotipi più comuni di *E. coli* associati a colite emorragica (O157:H7) dagli altri *E. coli* non patogeni. O157:H7 non fermenta il sorbitolo, e le colonie rimangono incolori, mentre gli altri *E. coli* danno colonie rosa sorbitolo-positive.

Malattie associate agli enterobatteri

INFEZIONI SISTEMICHE

Febbri enteriche (tifo, paratifo, in cui l'interessamento intestinale è associato a diffusione dell'infezione a tutto l'organismo con localizzazioni extraintestinali (es. epatiche)

INFEZIONI ESCLUSIVAMENTE INTESTINALI

Enteriti, gastroenteriti con diarrea o dissenteria (con mortalità infantile molto elevate nelle zone più povere del mondo)

Gli enterobatteri *NON INVASIVI* si localizzano nell'intestino tenue e producono enterotossine che stimolano l'attività secretoria della mucosa senza causare lesioni

Gli enterobatteri *INVASIVI* si localizzano in intestino tenue e colon, penetrano la mucosa e causano evidenti processi infiammatori con lesioni istopatologiche

INFEZIONI EXTRAINTESTINALI

Spesso con origine endogena, opportunistica: infezioni urinarie, nosocomiali, respiratorie

Clostridium perfringens (contaminazione fecale)

Frequentemente isolato in campioni clinici, può essere un semplice commensale o dare gravissime malattie. Il potere patogeno è dovuto principalmente a 12 tossine. Diversi tipi di *C. perfringens* producono diverse tossine

La tossina α , la più importante è l'unica prodotta da tutti i tipi di *C. perfringens*, provoca **lisi di eritrociti, leucociti, cellule endoteliali**.

L'enterotossina è termolabile, si lega a recettori dell'epitelio nell'intestino tenue ed altera il trasporto di ioni e fluidi.

Produce diversi enzimi degradativi (proteasi, ialuronidasi, collagenasi, ecc.) che distruggono i tessuti e promuovono la diffusione dell'infezione.

TABELLA 40-3. Fattori di virulenza associati al *Clostridium perfringens*

Fattori di virulenza	Attività biologica
α -tossina	Tossina letale; fosfolipasi C (lecitinasi); aumenta la permeabilità vascolare; emolisina; produce attività necrotizzante, come nella mionecrosi
β -tossina	Tossina letale; attività necrotizzante
ϵ -tossina	Tossina letale; permeasi
ι -tossina	Tossina letale, binaria; attività necrotizzante; adenosindifosfato (ADP)
δ -tossina	Emolisina
θ -tossina	Emolisina labile al calore ed all'ossigeno; citolitica
κ -tossina	Collagenasi; gelatinosi; attività necrotizzante
λ -tossina	Proteasi
μ -tossina	Ialuronidasi
ν -tossina	Desossiribonucleasi; emolisina; attività necrotizzante
Enterotossina	Altera la permeabilità di membrana nell'ileo (citotossica, enterotossica); superantigene
Neuraminidasi	Altera i recettori gangliosidici della superficie cellulare; promuove la trombosi capillare

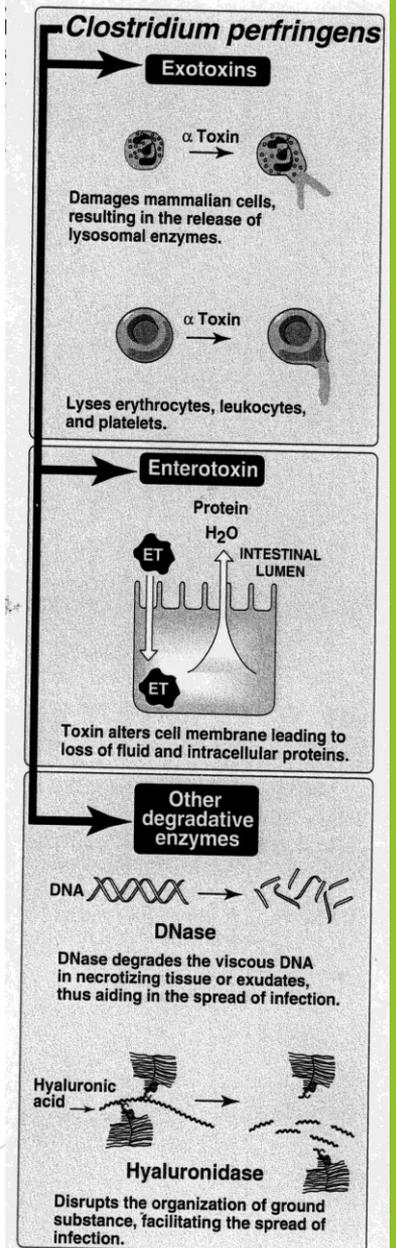


Figure 17.4
Toxins and degradative enzymes produced by *Clostridium perfringens*. [ET = enterotoxin.]

Intossicazione alimentare. Malattia comune, ma sottostimata, con breve incubazione (8-24h), senza febbre o vomito, ma con crampi addominali e diarrea acquosa. Guarigione in 1-2 giorni. Di solito la cottura non è sufficiente per eliminare le spore, il cibo non viene refrigerato per cui si ha germinazione e proliferazione del C. Il riscaldamento del cibo (a 70°C) può distruggere la tossina.

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

E' necessario un elevato numero di microrganismi

Alimenti a rischio

Carni cotte (arrosti)

Sughi di carne

Salse

raffreddati lentamente



Habitat

Intestino dell'uomo e degli animali

Terreno, polvere

Cause

Cibi conservati a temperatura ambiente

Cibi preparati con largo anticipo



Gangrena gassosa. Le spore introdotte (ferite, traumi, ecc.) germinano se il potenziale tissutale di ossidoriduzione diminuisce (per scarsa circolazione o danno tissutale). Spesso c'è coinfezione con altri batteri, fra cui anaerobi facoltativi che consumano l'ossigeno e favoriscono la crescita del C. Le tossine causano grave morte cellulare e gli enzimi distruggono il tessuto, favorendo la diffusione dell'infezione.

La fermentazione dei carboidrati tissutali produce gas, che si accumula nel sottocutaneo e produce un caratteristico crepitio alla palpazione (da cui il nome). Si formano copiosi essudati, e cattivo odore. Col progredire dell'infezione, l'aumentata permeabilità dei capillari consente alle tossine di diffondere ad altri siti, con effetti sistemici (shock, blocco renale, emolisi intravascolare, ecc.)

Cellulite anaerobia. Infezione del connettivo, non invade il tessuto muscolare



FIGURA 37-4. Cellulite da clostridio. I clostridi possono essere introdotti nei tessuti durante un intervento chirurgico o in seguito ad un trauma. Questo paziente ha subito una frattura composta della tibia. Cinque giorni dopo il trauma, la cute ha perso colore e si sono sviluppate bolle e necrosi. Si potevano osservare un essudato sieromematico e produzione di gas nel sottocutaneo, ma non c'era nessuna evidenza di necrosi muscolare. Il paziente guariva senza reliquati. (Da Lambert H, Farrar W, editors: *Infectious diseases illustrated*, London, 1982, Gower).

Stafilococco Aureo

Unico *S. patogeno* coagulasi +: produce l'esoenzima

S. aureus produce pigmenti carotenoidi, (colorazione giallo-oro alle colonie su agar). E' molto diffuso nella popolazione sana (20% di presenza), localizzato soprattutto su cute, nasofaringe, vagina. Lo stato di portatore può essere persistente.

Produce molti fattori di virulenza

TABELLA 22-3. Fattori di virulenza di *Staphylococcus aureus*

FATTORI DI VIRULENZA	EFFETTI BIOLOGICI
Componenti strutturali	
Capsula	Inibisce la chemiotassi e la fagocitosi; inibisce la proliferazione di cellule mononucleate; facilita l'adesione ai corpi estranei
Peptidoglicano	Fornisce stabilità osmotica; stimola la produzione di pirogeni endogeni (attività endotosina-simile); chemioattraente per i leucociti (formazione di ascesso); inibisce la fagocitosi
Acido teicoico	Regola la concentrazione cationica della membrana cellulare; si lega alla fibronectina
Proteina A	Inibisce la rimozione mediata da anticorpi legando i recettori per Fc di IgG ₁ , IgG ₂ e IgG ₄ ; chemioattraente per i leucociti; anticomplementare
Membrana citoplasmatica	Barriera osmotica; regola il trasporto dentro e fuori dalla cellula; sito di enzimi biosintetici e respiratori
Tossine	
Citotossine (α , β , δ , γ , P-V leucocidina)	Tossiche per molte cellule, inclusi leucociti, eritrociti, macrofagi, piastrine e fibroblasti
Tossine esfoliative (ETA, ETB)	Serino proteasi che rompono i ponti intercellulari nello strato granuloso dell'epidermide
Enterotossine (A-E, G-I)	Superantigeni (stimolano la proliferazione dei linfociti T ed il rilascio di citochine); stimolano la liberazione di mediatori dell'infiammazione nei mastociti, incrementando la peristalsi intestinale e la perdita di liquidi, così come nausea e vomito
Tossina-1 della sindrome da shock tossico	Superantigene (stimola la proliferazione dei linfociti T ed il rilascio di citochine); produce perdita o distruzione cellulare delle cellule endoteliali
Enzimi	
Coagulasi	Trasforma il fibrinogeno in fibrina
Catalasi	Converte il perossido d'idrogeno in acqua ed ossigeno
Ialuronidasi	Idrolizza gli acidi ialuronici del tessuto connettivo favorendo la diffusione degli stafilococchi nel tessuto
Fibrinolisinasi	Scioglie i coaguli di fibrina
Lipasi	Idrolizza i lipidi
Nucleasi	Idrolizza il DNA
Penicillinasi	Idrolizza le penicilline

P-V = Panton-Valentine.

Gastroenterite da avvelenamento alimentare: si tratta di intossicazione non contagiosa, non di infezione. Brevissima incubazione (4-6h), dovuta all' ingestione di cibo contaminato da parte di operatori infettati o attraverso latte/formaggi (specie in maionese, dolci, insalate, gelati o carni salate). Il cibo contaminato deve rimanere a temperatura ambiente perché i batteri producano la tossina. Il successivo riscaldamento può uccidere i batteri, ma non eliminare la tossina. La malattia dura circa 24 ore, con vomito, dolori addominali, nausea, diarrea acquosa, senza febbre. Inutili gli antibiotici. Potenziale uso della tossina come arma batteriologica per ingestione o respirazione (in basse dosi può causare febbre, tosse, diff. respiratorie, in alte dosi può essere molto grave).

Enterocolite: alcuni ceppi di *S. aureus* possono causare infezione del tratto enterico soprattutto in pazienti trattati con antibiotici a largo spettro (eliminazione flora normale, proliferazione St., produzione enterotossina A)

Sindrome st. della cute scottata: (chiamata anche malattia di Ritter) necrosi epidermica acuta in paz suscettibili comincia con un eritema periorale che in 2 giorni diffonde a tutto il corpo. Si formano bolle che contengono liquido chiaro (senza batteri). Guarigione in 7-10 giorni. Positività al "segno di Nikolsky". [L'impetigine bollosa è una forma localizzata, le vescicole contengono batteri e non c'è segno di Nikolsky]

Nikolsky's sign is a condition caused by a staphylococcal infection in which the superficial layers of skin slip free from the lower layers with a slight rubbing pressure. Large areas of the skin will blister and peel away leaving wet, red and painful areas.



Nikolsky's Sign:
skin reddens, fluid
collects underneath,
and skin rubs off,
leaving raw red base

Aspergillus (Muffa)

Il genere Aspergillus è quello che include il maggior numero di specie tossigene:

- **Asp. flavus**
- **Asp. parasiticus**
- Asp. versicolor
- Asp. ochraceus
- Asp. clavatus

– Il fegato e il rene sono gli organi principalmente colpiti

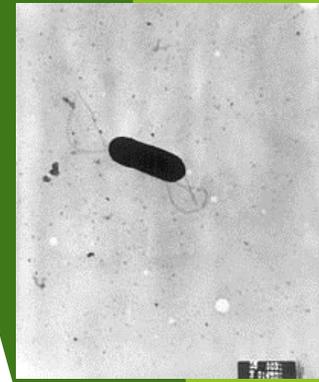
La maggior parte delle **micotossicosi** deriva dal consumo di cibi contaminati

– Il contatto attraverso la pelle con substrati infettati da muffe e l'inalazione di **tossine** prodotte da spore sono altre fonti importanti di esposizione

Le **aflatossine** sono prodotte da Aspergillus flavus e Aspergillus parasiticus

- In particolare, Aspergillus flavus è un contaminante comune in agricoltura. La contaminazione da aflatossine del mangime è stata spesso legata all'aumento di mortalità in animali da allevamento
- Il problema per l'uomo sta nel fatto che prodotti derivati dal latte possono diventare fonte di aflatossine

Listeria monocytogenes



Batterio Gram positivo

Asporigeno

Anaerobio facoltativo

Catalasi positivo ma ossidasi negativo.

Si mantiene vitale anche a 0 °C e fino a temperature prossime a quelle usate per la pastorizzazione, questo fa sì che la sua presenza tra i microrganismi infettanti negli alimenti a consumo umano ne sia tra quelli più presenti ed infestanti

Presenta buona resistenza a condizioni di pH (tra 4,4 e 9,6) e temperatura, caratteristiche che lo rendono un potenziale contaminante di alimenti, anche se conservati in frigorifero.

È un parassita intracellulare, riuscendo a evadere efficacemente dal fagosoma.

Possiede una peculiare proteina con attività enzimatica polimerizzante l'actina (ActA): il batterio si crea una "coda" di actina che gli dà la propulsione necessaria a superare la membrana plasmatica della cellula ospite, passando così direttamente nella cellula adiacente.

Responsabile della **listeriosi**: batteriemie e meningiti

Variabile, ma si stima che sia di 3-70 giorni, con una mediana di 3 settimane; per i sintomi gastrointestinali, si stima invece un'incubazione di poco superiore alle 12 ore.

Si cura con antibiotici, in particolare ampicillina o penicillina

VIA DI TRASMISSIONE

Attraverso i cibi

È la via più comune, sia che la contaminazione sia primaria (cioè che l'alimento si sia contaminato a livello agricolo) che acquisita durante la lavorazione (è facile che gli impianti siano contaminati).

I **formaggi molli**, o in generale quelli non a pasta dura, sono ritenuti più a rischio (compreso per esempio il Gorgonzola), ma altri vettori comuni sono **latte crudo**, o pastorizzato in maniera incompleta, **verdura contaminata** se consumata cruda, carne pronta al consumo (es., paté), **carne cruda**, **gelato**, **salumi crudi** (in alcuni casi il prosciutto è stato contaminato al momento del taglio da macchine poco pulite), salsa guacamole, pollame sia crudo che cotto (specie se in insalata), pesce crudo, in salamoia e affumicato (anche insalate di mare); il batterio è stato isolato anche in meloni venduti già tagliati e in insalate di patate.

Bisogna prestare attenzione al fatto che **questo patogeno cresce anche nei prodotti refrigerati.**

Indicatori di salubrità

- ⊗ Sono rappresentati da quei microrganismi il cui numero per grammo è un parametro di **rischio** per il consumatore.
- ⊗ Sono **patogeni** responsabili di **infezioni** e **intossicazioni** alimentari. La loro presenza aumenta il rischio di malattia.
- ⊗ Raramente causano alterazioni negli alimenti.

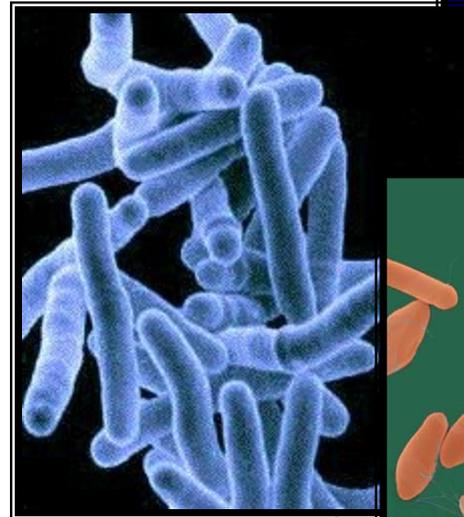
Esempi:

Vibrio cholerae

Mycobacterium tuberculosis

Clostridium botulinum

etc



Vibrio cholerae

Bacillo G-, forma a virgola, mobili con 1 flagello polare, asporigeni, acapsulati, aerobi facoltativi, metabolismo fermentativo.

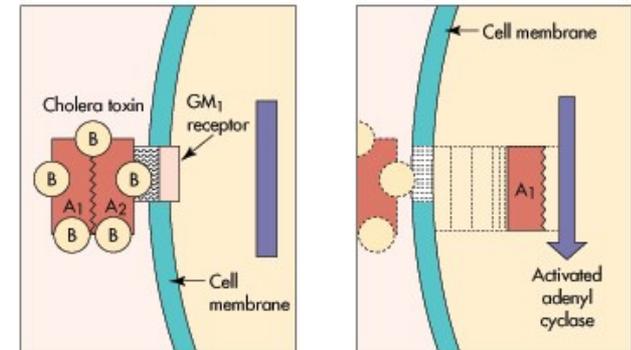
Dopo l'ingestione, il vibrione infetta l'intestino. Le adesine sono importanti per colonizzazione e virulenza. Il batterio non è invasivo, e causa malattia attraverso una enterotossina, che si lega a recettori sulle cellule intestinali e causa secrezione di elettroliti e acqua, anche 1 litro all'ora.

Causa diarrea acquosa (feci ad acqua di riso), con mortalità elevata in mancanza di trattamento (60% vs >1%)

Sono disponibili un paio di vaccini, che hanno però dimostrato utilità limitata, con immunità breve ed incompleta

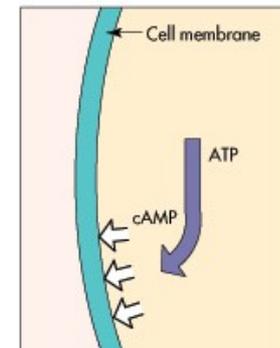
TABLE 32-2. Virulence Factors of *Vibrio cholerae* O1 and O139

Virulence Factor	Biologic Effect
Cholera toxin	Hypersecretion of electrolytes and water
Toxin co-regulated pilus	Adherence to intestinal mucosal cells; binding site for CTX ϕ
Accessory cholera enterotoxin	Increases intestinal fluid secretion
Zonula occludens toxin	Increases intestinal permeability
Colonization factor	Adhesin factor
Neuraminidase	Modifies cell surface to increase GM ₁ binding sites for cholera toxin

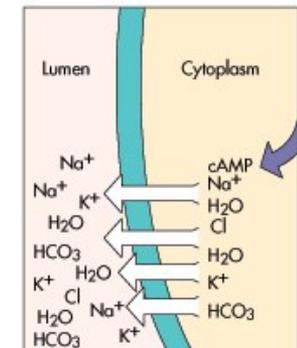


The complete toxin binding to the GM₁-ganglioside receptor on the cell membrane via the binding subunits (B).

The active portion (A₁) of the A subunit enters the cell and activates adenylyl cyclase.



This activity results in accumulation of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) along the cell membrane.



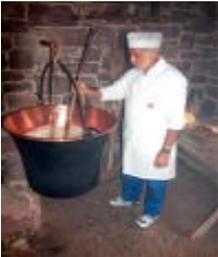
The cAMP causes the active secretion of sodium (Na⁺), chloride (Cl⁻), potassium (K⁺), bicarbonate (HCO₃⁻), and water (H₂O) out of the cell into the intestinal lumen.

Indicatori di tipicità o protecnologici

Sono rappresentati da quei **microrganismi utili** che caratterizzano il prodotto, ad esempio **i batteri lattici** nello yogurt, nei formaggi, nel salame fermentato, etc.

Quando presenti, il loro sviluppo viene privilegiato nel substrato.

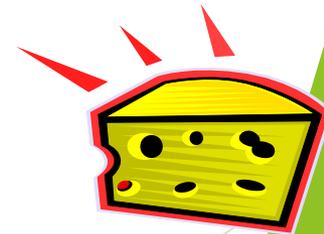
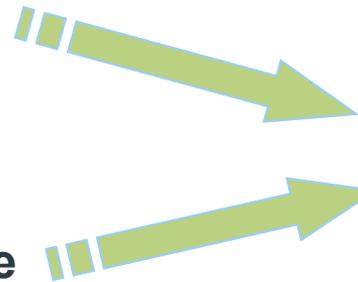
Possono essere presenti come **microflora autoctona** nelle materie prime, come **microflora coltivata** in innesti naturali in lavorazioni tradizionali, come **colture selezionate** in laboratorio e aggiunte durante il processo



Microflora autoctona,
coltivata



Colture selezionate



In molti alimenti tali indicatori sono assenti.

Indicatori di tipicità

Il valore numerico di questo indice (**UFC/g o ml**) caratterizza l'alimento in termini di qualità e di tipicità

- Durante la **conservazione** tali indicatori vanno incontro ad una diminuzione o a una totale scomparsa;
- è importante saper gestire il loro periodo vitale e le loro attività metaboliche utili

Tracciabilità attraverso riconoscimento della microflora tipica



Esempi



Microflore autoctone

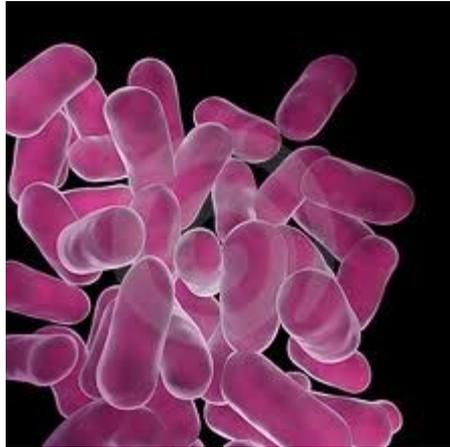
Materia prima	Gruppo microbico	Prodotto finito
Latte crudo	<i>Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus, Lactobacillus</i>	Alcuni formaggi D.O.P.
Siero-innesti	<i>Lactobacillus, Streptococcus</i>	Alcuni formaggi D.O.P.
Carni crude suine	<i>Staphylococcus, Micrococcus</i>	Salami tradizionali
Uve, mosti	<i>Saccharomyces, Hanseniaspora</i>	Alcuni vini D.O.C.
Olive, cavoli, rape, cetrioli	<i>Lactobacillus, Leuconostoc</i>	Vegetali fermentati
Madri per aceto	<i>Acetobacter, Gluconobacter</i>	Aceti tradizionali
Madri per prodotti da forno	<i>Lactobacillus, Candida</i>	Pani regionali, Dolci tradizionali da ricorrenza, Merendine

Lactobacilli

Batteri Gram positivi anaerobi facoltativi di forma bastoncellare

Convertono il lattosio e altri zuccheri in acido lattico mediante la **fermentazione lattica**

Riducono il pH dell'ambiente in cui crescono: *l'acidificazione del loro ambiente inibisce la crescita di alcuni microrganismi patogeni*



Omofermentativi: producono quasi esclusivamente acido lattico (oltre il 90% dei prodotti di fermentazione)

Eterofermentativi: fermentazione eterolattica, con secrezioni composte per circa il 50% di acido lattico e 50% di altre sostanze

CLASSIFICAZIONE

Omofermentativi obbligati (Gruppo I)

L. acidophilus

Eterofermentativi Facoltativi (Gruppo II)

L. casei, L. sakei

Eterofermentativi obbligati (Gruppo III)

L. brevis

Impieghi

Produzione di alimenti fermentati:

Crauti, olive verdi, sottaceti, insaccati, prodotti da forno, formaggi, bevande fermentate lattiche.

Alterazione di alimenti:

Birra, frutta, pesce marinato, latte, carne e prodotti carnei, bevande fermentate

Probiotica

Alcune specie sono capaci di apportare benefici alla salute umana:

Lb. acidophilus, Lb. casei, Lb. johnsonii, Lb. reuteri, Lb. rhamnosus, Lb. salivarius, Lb. crispatus e Lb. plantarum.

Starter selezionati

Specie microbica	Prodotto finito
<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp.)	Yogurt (e latti fermentati)
<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	Alcuni formaggi
<i>Penicillium camemberti</i> <i>Penicillium roqueforti</i>	
<i>Propionibacterium shermani</i>	
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Salumi
<i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces pastorianus</i> <i>Saccharomyces bayanus</i>	Alcuni vini D.O.C. e alcune birre
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pane, pizza, grissini

Alterazioni causate dalla contaminazione microbica

I microrganismi alterativi possono attaccare, per soddisfare le proprie esigenze nutrizionali, tutti i componenti di un alimento

CARBOIDRATI



PROTEINE



LIPIDI



I prodotti finali di queste attività metaboliche provocano **modificazioni strutturali e sensoriali** che noi percepiamo come alterazioni

Carboidrati

I carboidrati complessi vengono dapprima degradati a zuccheri semplici e poi questi possono venire decomposti, in anaerobiosi, secondo 6 vie fermentative. In aerobiosi vengono demoliti attraverso la via respiratoria.

Fermentazione	Prodotti finali	Microrganismi
F. Alcolica	Alcol etilico e CO ₂	Lieviti e alcune muffe
F. Omolattica	Acido lattico	Lattobacilli, lattococchi, streptococchi, enterococchi, pediococchi, stafilococchi, alcuni <i>Bacillus</i>
F. etero-lattica	A. lattico, a. acetico o etanolo e CO ₂	Lattobacilli e Leuconostoc
F. acido-mista	A. lattico, a. formico o 2,3 butilen-glicole	Enterobatteri e vibrioni
F. Butirrica o aceton-butilica	A. butirrico, CO ₂ Idrogeno	Clostridi
F. propionica	A. propionico, a. acetico, CO ₂	Propionibatteri

Proteine

Possono essere idrolizzate dagli enzimi microbici (**Proteinasi**) a polipeptidi, peptidi semplici (**peptidasi**) ed amminoacidi (aa). La decomposizione anaerobica delle proteine fino ad aa viene chiamata **Putrefazione**. Gli aa possono venire decomposti in sostanze maleodoranti come ammine, anidride solforosa, solfuro di metile, mercaptani, ammoniacca, indolo.



Deamminazione ossidativa	Chetoamminoacidi + ammoniacca
Deamminazione idrolitica	Idrossiacidi + ammoniacca
Deamminazione riduttiva	A. grassi saturi + ammoniacca
Decarbossilazione	Ammine + CO ₂
Ossidoriduzione tra due amminoacidi	Chetoacidi + A. grassi + ammoniacca

Lipidi

Gli enzimi LIPASI idrolizzano:

I **trigliceridi** ad acidi grassi e glicerolo;

i **fosfolipidi** ad acidi grassi, glicerolo, fosfato ed ammine

Acidi organici: in aerobiosi vengono ossidati in **H₂O** e **CO₂** oppure trasformati in acidi più semplici.

Acidi nucleici: vengono degradati a **purine** e **pirimidine**, a loro volta idrolizzate a **ribosio**, **basi azotate** e **fosfato**

Alcoli: vengono ossidati nelle corrispondenti **aldeidi** e in **acidi carbossilici**

Aldeidi: vengono ossidate nei corrispondenti **acidi carbossilici** o vengono ridotte ad **alcoli**

Prodotti finali delle attività microbiche

<i>Metaboliti</i>	<i>Alimento</i>
Alcol etilico, diacetile	Succhi di frutta
Acido acetico	Vino, birra, sidro
Acidi grassi volatili	Crema di latte, burro, grassi animali
Acido lattico	Latte, conserven vegetali, conserven animali, pasta fresca
Cadaverina, putrescina	Carne sottovuoto
Trimetilammina, azoto volatile totale	Pesce fresco
Istamina	Conserven di pesce

Profilo microbiologico delle acque

MICROFLORA AUTOCTONA

BATTERI

Pseudomonas
Xantomonas
Acinetobacter
Moraxella
Flavobacterium

ORGANISMI CONTAMINANTI

BATTERI

Bacillus
Sarcina
Aeromonas
Arthrobacter
Yersinia
Salmonella
Shigella
Pasteurella
Leptospira
Vibrio

MUFFE

Histoplasma
Aspergillus
Geotrichum
Cladosporium

PROTOZOI

Zooflagellati
Ciliati
Amebe
Entamoeba
Giardia
Criptosporidium

VIRUS

H.A.V.
PolioVirus
Enterovirus
Adenovirus
Coxsackiae

ALGHE

Anabaena
Spirulina
Oscillatoria
Scenedesmus
Nostoc

ELMINTI

Ascaridi
Ossiuri

Requisiti di qualità delle acque dolci superficiali utilizzate per l'approvvigionamento idrico

Parametri	Categoria A1	Categoria A2	Categoria A3
Microbiologici			
Coliformi totali	50 / 100 ml	5.000 / 100 ml	50.000 / 100 ml
Coliformi fecali	20 / 100 ml	2.000 / 100 ml	20.000 / 100 ml
Enterococchi	20 / 100 ml	1.000 / 100 ml	10.000 / 100 ml
Salmonella	Ass. in 5 litri	Ass. in 1 litro	

Categoria A1: Trattamento fisico semplice e disinfezione

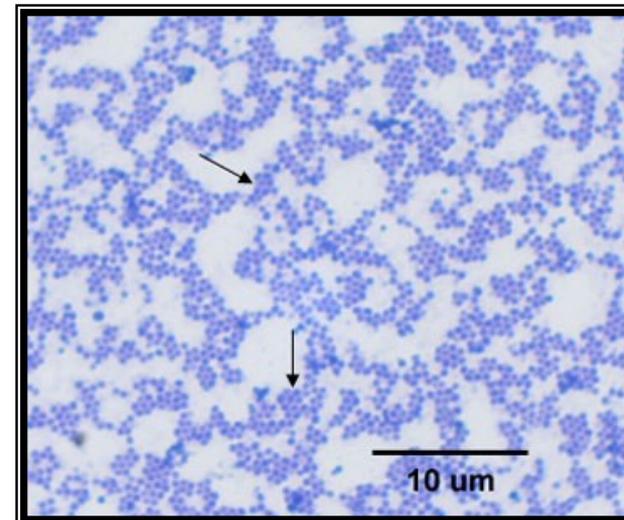
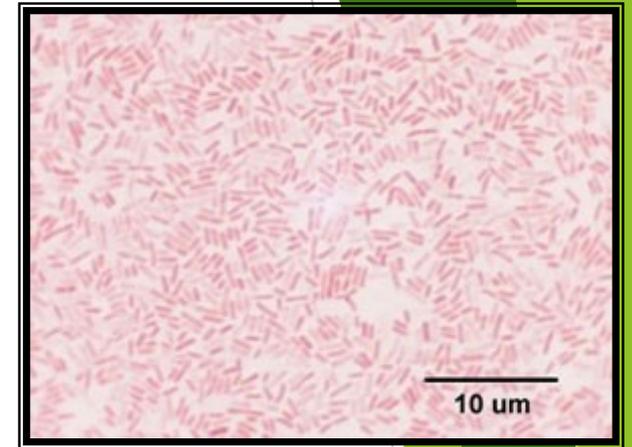
Categoria A2: Trattamento fisico e chimico normale e disinfezione

Categoria A3: Trattamento fisico e chimico spinto, affinazione e disinfezione

PROTOCOLLO GENERALE DI ANALISI MICROBIOLOGICA

Carica batterica aerobia

- ▶ Enterobatteri totali
- ▶ Coliformi
- ▶ *Salmonella*
- ▶ Stafilococchi potenzialmente patogeni
- ▶ Streptococchi fecali
- ▶ Clostridi solfito-riduttori
- ▶ *Clostridium perfringens*
- ▶ Lieviti e muffe



ISOLAMENTO DEGLI ENTEROBATTERI

Si utilizza il terreno **MacConkey**;

- non presentano particolari esigenze nutrizionali, sono in grado di svilupparsi su un gran numero di substrati utilizzando i più svariati composti dell'azoto e del carbonio;
- hanno la capacità di svilupparsi entro un ambito di temperatura molto ampio;
- hanno la capacità di produrre grandi quantità di acidi e di gas dagli idrati di carbonio;
- hanno la capacità di produrre, sui materiali in cui sviluppano, odori sgradevoli;
- alcune specie in particolare alcuni sierotipi di *E. coli* risultano patogene.

MacConkey-Agar differenzia i batteri fermentanti il lattosio (es. coliformi) da quelli non fermentanti (es. *Citrobacter*) e patogeni enterici (*Salmonella* e *Shigella*).



<i>Enterobacter cloacae</i> :	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
lattosio fermentante..	Lattosio non fermentante	non cresce
colonie rosa	Colonie senza colore	

E' un terreno **selettivo** e **differenziale**: la presenza di sali biliari e cristal violetto inibisce la crescita dei gram-positivi. La presenza di lattosio e rosso fenolo (indicatore di pH) differenzia i gram-negativi fermentanti da quelli non fermentanti

Definizione di latte

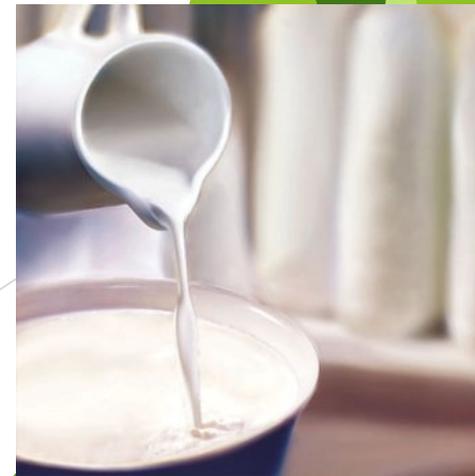
- Il **LATTE ALIMENTARE** è il prodotto ottenuto dalla mungitura regolare, ininterrotta e completa delle vacche lattifere in buono stato di salute e nutrizione (legge n. 15 del R.D. 9 maggio 1929).
- Con la sola parola **LATTE** si intende il latte proveniente dalla vacca. Il latte degli altri animali deve portare la denominazione della specie.



Latte

- Poichè il latte contiene carboidrati, acidi grassi, minerali, vitamine, proteine, pH = 6.8 è sensibile alla degradazione di diversi microrganismi;
- Contaminazione ridotta dalla **pastorizzazione**.
- Flora del latte: *Lactobacillus*
Microbacterium
Micrococcus
Streptococcus.

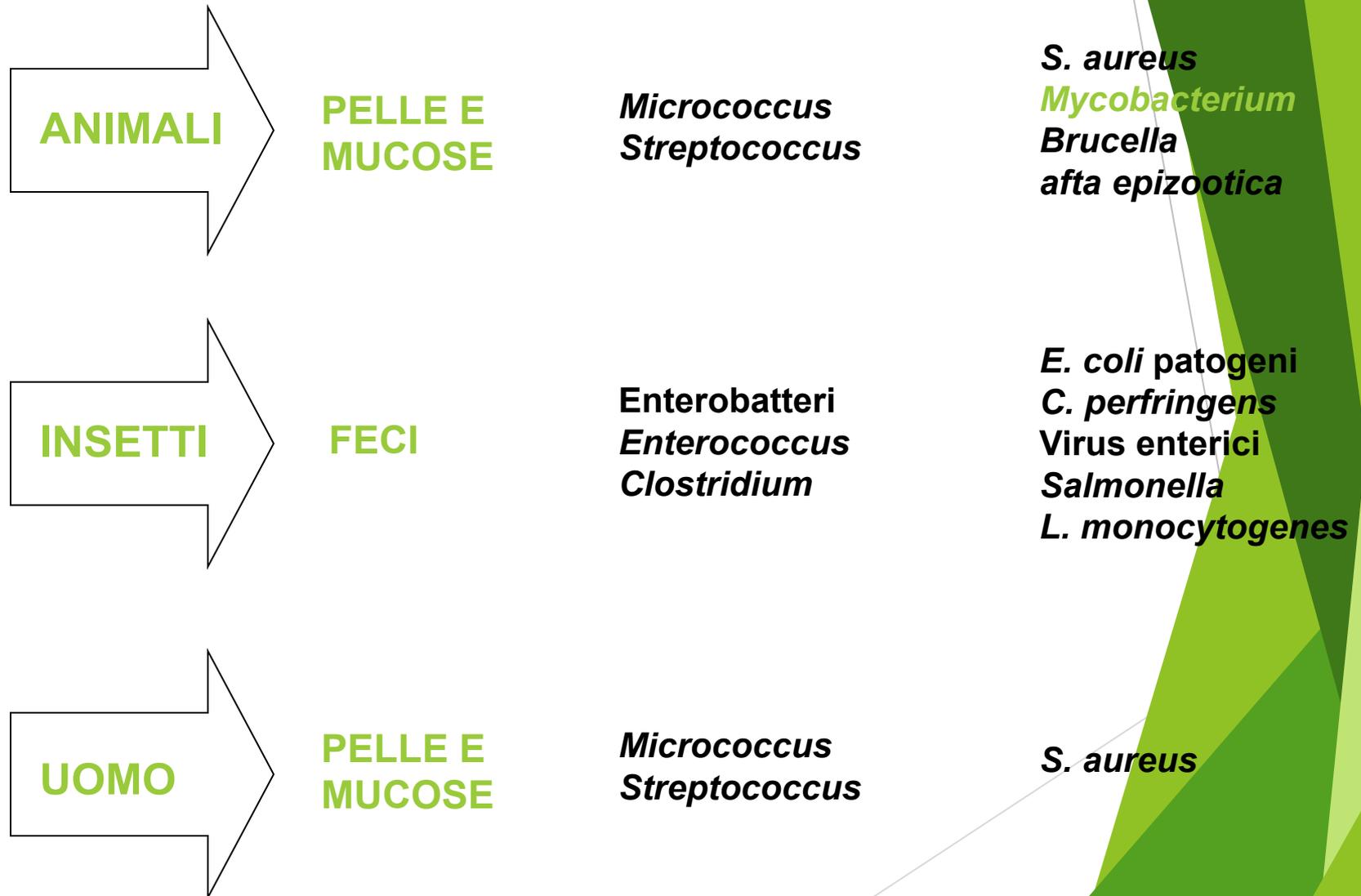
Malattie trasmissibili: Brucellosi, dissenteria, listeriosi, etc.



Potere batteriostatico o battericida naturale del latte crudo

- ▶ Dura 24-72 h e si evidenzia a 0° C-5° C.
- ▶ Enzimi importanti:
 - ▶ **Lattienina**: enzima termolabile ossidasico;
 - ▶ **Lattoperossidasi**: enzima sintetizzato dalla ghiandola mammaria, associata alle proteine del siero, contiene ferro; è attivo contro alcuni streptococchi e lattobacilli;
 - ▶ **Tiocianato**;
 - ▶ **Lattoferrina**: glicoproteina del siero del sangue; contiene ferro ed ha un'azione chelante;
 - ▶ **Agglutinine**: anticorpi presenti a basso titolo nel latte e ad alto titolo nel colostro;
 - ▶ **Lisozima**.

Fonti di contaminazione del latte crudo

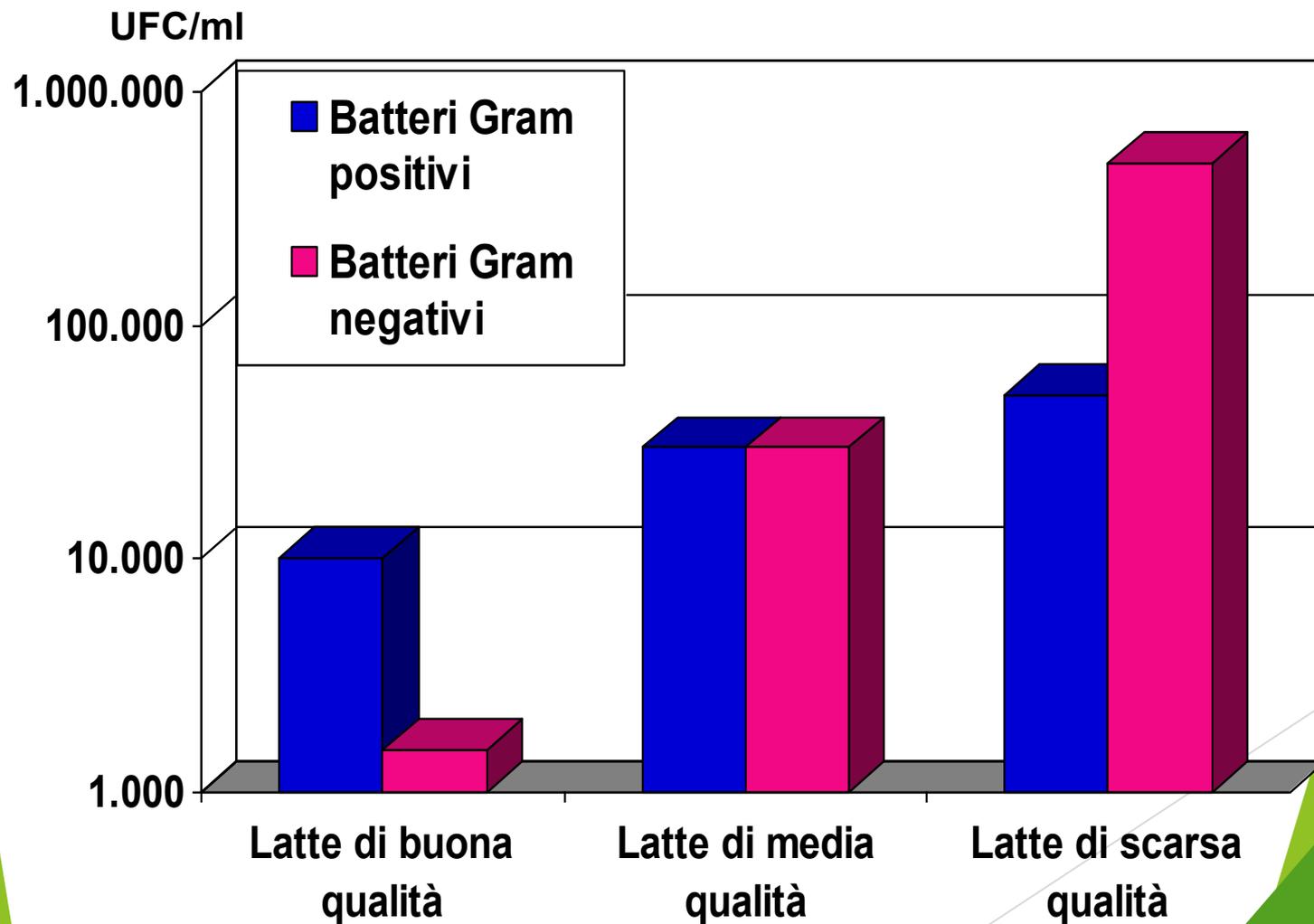


Fonti di contaminazione del latte crudo



ARIA	<i>Bacillus</i> Spore di miceti	<i>B. cereus</i>
ACQUA	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>
MANGIME	<i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i> Batteri lattici Spore di miceti	<i>B. cereus</i>
ATTREZZATURE	<i>Pseudomonadas</i>	<i>P. aeruginosa</i>
SUOLO	<i>Pseudomonadas</i> Enterobatteri <i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>C. botulinum</i> <i>L. monocytogenes</i>

Livelli qualitativi e composizione della microflora di latte crudo



Definizione di pastorizzazione del latte

● E' un processo di riscaldamento termico (trattamento minimo, 72°C per 15s) che consente di **eliminare tutti i microrganismi patogeni non sporigeni** e gran parte della microflora saprofitica senza provocare sostanziali modificazioni sensoriali, fisiche e nutrizionali.

● Il prodotto finito deve essere mantenuto refrigerato ($T < 6^{\circ}\text{C}$).

● Ha un tempo di conservazione limitato.

<i>Trattamento termico</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>Fosfatasi</i>	<i>Perossidasi</i>
Termizzazione	65° – 70°C	15 – 30 s	+	+
Pastorizzazione LTLT	63°C	30 min	-	+
Pastorizzazione HTST	72° – 75°C	15 – 30 s	-	+
Pastorizzazione flash	82° – 85°C	3 – 5 s	-	+
Ultrapastorizzazione	130°C	< 1 s	-	-

Effetti dei trattamenti termici sul latte

► Pastorizzazione

- Distruzione dei microrganismi patogeni non sporigeni;
- Conservabilità a 4°C per 6gg;
- Denaturazione del 10-25% delle sieroproteine ed enzimi nativi tranne perossidasi.

► Sterilizzazione (UTH)

- Distruzione di alcune spore;
- Conservazione a temperatura ambiente per 3 mesi;
- Denaturazione delle sieroproteine fino al 90%.

► Sterilizzazione a 2 stadi

- Distruzione di tutte le spore;
- Conservazione a temperatura ambiente per 1 anno;
- Denaturazione completa delle sieroproteine.

Termodurici

i microrganismi che resistono alla pastorizzazione

Bacillus

Clostridium

Microbacterium

Enterococcus

Streptococcus

I microrganismi di ricontaminazione

Pseudomonas,

Alcaligenes,

Coliformi

**(*Citrobacter, Enterobacter,*
Escherichia, Klebsiella, Serratia)**

Le alterazioni del latte



Inacidimento, coagulazione acida	Batteri acidificanti	<i>Enterococcus, Streptococcus, Bacillus, Enterobacteriaceae</i>
Coagulazione “dolce”		<i>Bacillus</i>
Sviluppo di off flavours (odore di putrido, amaro odore di fruttato)	Batteri proteolitici e lipolitici Lieviti	<i>Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae Kluyveromices</i>
Filante	Batteri produttori di polisacc. extracellulari	<i>Leuconostoc, Lactobacillus Alcaligenes</i>
Rigonfiamento	Batteri produttori di gas	Coliformi



I patogeni

Bacillus cereus



Bacillus cereus e alimenti

Fonti di contaminazione degli alimenti

Spore veicolate dal terreno e la polvere.

- Latte crudo, pastorizzato, UHT e in polvere;
- Carne cruda e congelata di bovino, suini e pollame;
- Prodotti carnei freschi e stagionati;
- Riso (produzione di tossina emetica);
- Uova intere, crude e pastorizzate;
- Prodotti da forno;
- Spezie;
- Insalate.

ALIMENTO	T°C	D (min)	z
LATTE	95	1,8	9,4
	95	3	-
	95	19,1	-
ACQUA	95	36	6,7
BRODO DI RISO	100	4,2	-
PANE	95	36,2	-
OLIO DI OLIVA	121	17,5	-

Possibilità delle spore di sopravvivere ai trattamenti UHT.

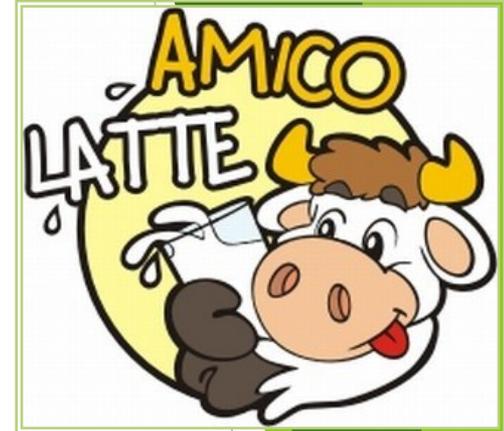
Pastorizzazione: insufficiente ad eliminare le spore. Mancata competizione per eliminazione della microflora non sporigena.

Analisi microbiologica del latte

Dipende da come è stato prodotto e conservato.

Due metodi utilizzati sono:

1. Conteggio vitale;
2. Test della riduttasi.



Test della riduttasi

	0'	30'	1h	1h30'	2h	2h30'	17h
Latte sterile (1)				blu		blu	blu
Latte sterile (2)							
Latte lasciato a r.t. aperto 2 giorni (3)				blu		Blu Gram -	bianco
Latte scaduto (4)				bianco			
Latte con 1 ml di coltura di <i>E. coli</i> (5).				Azzurro chiaro		celeste	bianco
Latte con 1 ml di coltura di <i>E. coli</i> pastorizzato (6)				azzurro		celeste	bianco
Latte con 1 ml di coltura di <i>B. subtilis</i> pastorizzato (7).				bianco			

Prodotti vegetali freschi

Dopo la raccolta i vegetali sono considerati prodotti alimentari

- **Sono tessuti vegetali costituiti da cellule viventi**
- **I microrganismi provengono da esterno**

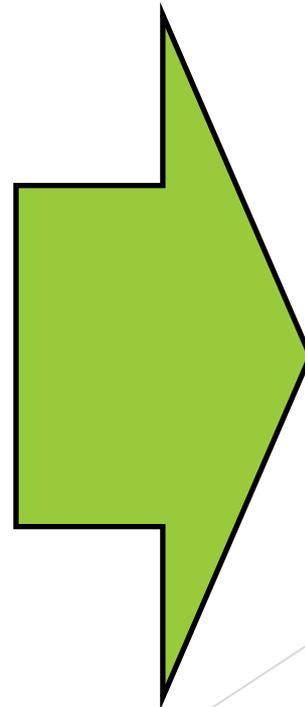
→ **Suolo**

→ **Acqua**

→ **Aria**

→ **Patogeni della pianta**

(insetti, acari, elminti, muffe,
batteri, virus)



**coltivazione,
raccolta,
trasporto,
conservazione,
lavorazione primaria**

Ortaggi freschi

La qualità microbiologica è in funzione:

- **Parte commestibile**
- **Composizione chimica**
- **Condizioni colturali/attività umane**
- **Condizioni ambientali**

Parti commestibili:

- **Radice** *Carota, Rapa, Bietola*
- **Tubero** *Patata, Patata americana, Topinambur, Cassava (tapioca)*
- **Bulbo** *Cipolla, Aglio, Porro,*
- **Foglia** *Cavolo, Spinacio, Insalate (Lattuga, Radicchio, Indivia, etc.)*
- **Germoglio** *Soia, Asparago, Finocchio*
- **Fiore** *Cavolfiore, Broccolo, Carciofo*
- **Frutto** *Oliva, Pomodoro, Peperone, Melanzana, Zucchina, Cetriolo*
- **Seme** *Pisello, Fagiolo, Cece, Lenticchia*

Ortaggi freschi

Muffe

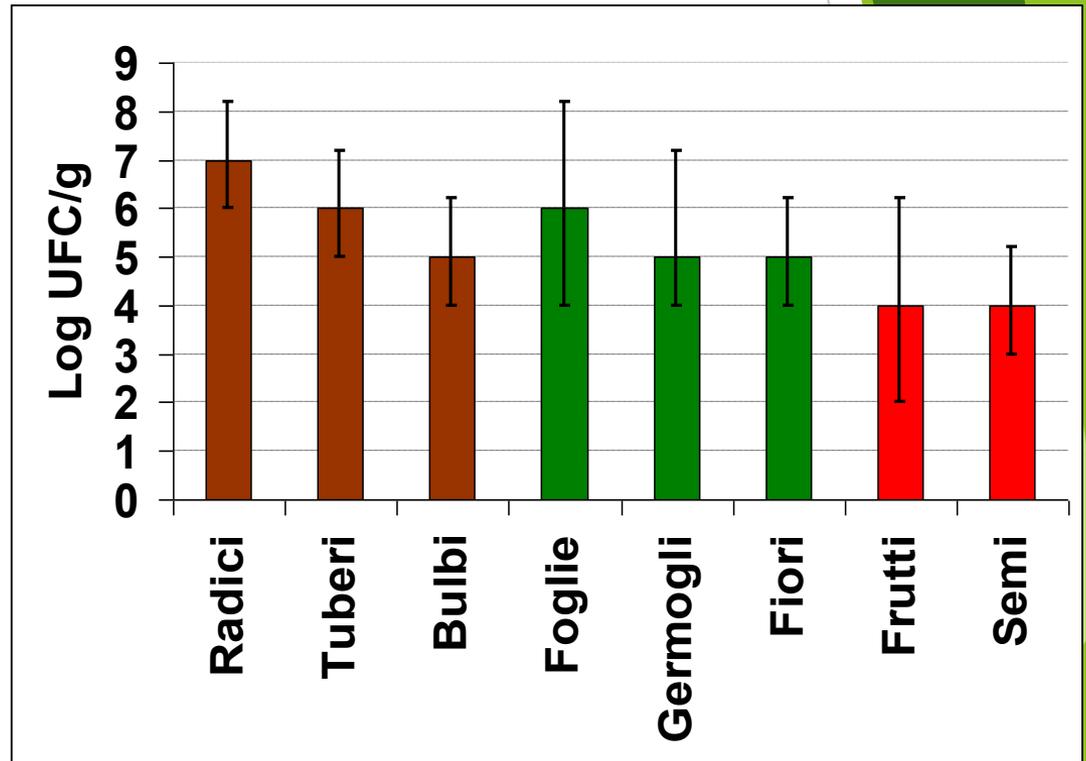
Alternaria,
Botrytis,
Cladosporium,
Fusarium,
Phytophthora,
Rhizopus

Batteri

Pseudomonas,
Flavobacterium,
Xanthomonas,
Flavobacterium,
Enterobacter,
Erwinia,
Klebsiella,
Serratia,

Bacillus,
Leuconostoc,
Streptomyces

Contaminazione batterica media in ortaggi freschi

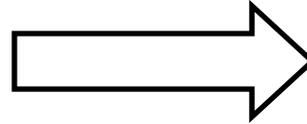


Microflora considerata normale sulla frutta e s ortaggi freschi

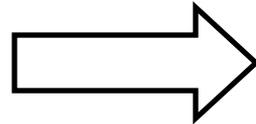
Cariche totali	10^5 - 10^8 cfu/g. Rappresentata soprattutto da Gram-negativi come <i>Pseudomonas</i>
Lieviti	10^4 - 10^5 cfu/g
Muffe	$\leq 10^4$ cfu/g
Batteri lattici	10^3 - 10^4 cfu/g
Enterobatteri	10^4 - 10^6 cfu/g
<i>Salmonella</i>	Si ritrovano solo in caso di prodotti irrigati con acque non idonee
<i>S. aureus</i>	assente
<i>P. aeruginosa</i>	< 100 cfu/g

La qualità microbiologica di pasta fresca e di un prodotto da forno lievitato

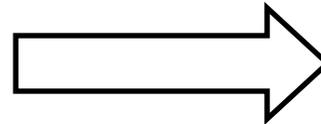
Materie prime



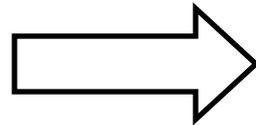
Tecnologia



Igiene del Personale



Ambiente



Profilo microbico di paste fresche

Contaminanti

Coliformi	←	Igiene ambientale e Materie prime
<i>Escherichia coli</i>	←	Contaminazione fecale
Enterococchi	←	Igiene ambientale e Materie prime
Micrococchi e Stafilococchi	←	Manipolazione e Materie prime
Muffe	←	Igiene ambientale

Patogeni

<i>Bacillus cereus</i>	←	Materie prime (farina, spezie, ortaggi)
<i>Clostridium perfringens</i>	←	Igiene e Materie prime (carni)
<i>Listeria monocytogenes</i>	←	Igiene e Materie prime (carni, ortaggi)
<i>Salmonella</i>	←	Materie prime (uova, carni)
<i>Shigella</i>	←	Materie prime (uova, carni)
<i>Staphylococcus aureus</i>	←	Manipolazione

Salmonella

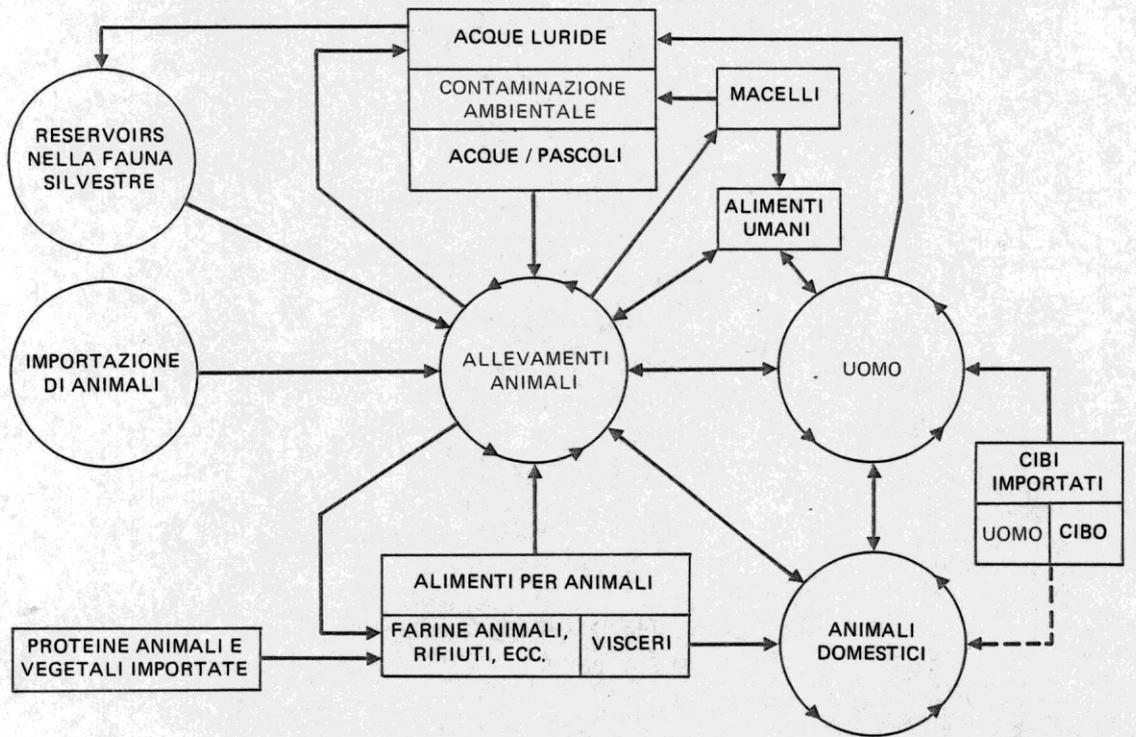
Numerosi ceppi, caratterizzati da antigeni O, H e Vi (analoghi a K). Non fermentano il lattosio. Molti ceppi sono ubiquitari, e possono causare gastroenteriti, i ceppi con **trasmissione interumana diretta orofecale** causano gravi forme sistemiche.

Tabella 21.3.

Principali quadri patologici sostenuti da *Salmonelle*.

1 - *Gastroenteriti*: sono le manifestazioni morbose che si osservano con maggiore frequenza, generalmente con tendenza alla guarigione spontanea, sono causate da *serovar* ubiquitari ampiamente diffusi in animali da allevamento (salmonellosi «minori»).

2 - *Salmonellosi sistemiche* (tifo e paratifi): esclusivamente da *serovar* adattati all'uomo (*Salmonella typhi*, *S. paratyphi A.*, etc.).



Salmonella è diffusa in natura e si trova in quasi tutti gli animali. Negli USA si stimano 1.4 milioni di casi all'anno, con circa 30.000 casi confermati e più di 500 morti. Descritti casi di trasmissione da animali (tartarughe, ovini, volatili, ecc.)

Sono una delle cause più frequenti di tossinfezioni alimentari nel mondo industrializzato. Animali e loro derivati (come carne e latte consumati crudi o non pastorizzati) e l'acqua (e acque non potabili) rappresentano i principali veicoli di trasmissione.

Figura 21.13.
Circolazione ambientale delle salmonelle «minori».

La sicurezza d'uso e la stabilità nei prodotti da forno

200-240°C

temperatura



< 100°C



umidità

$a_w = 0.92-0.97$

Alterazioni microbiche in pane e prodotti lievitati

Difetto di ammuffimento

Fonti di contaminazione:

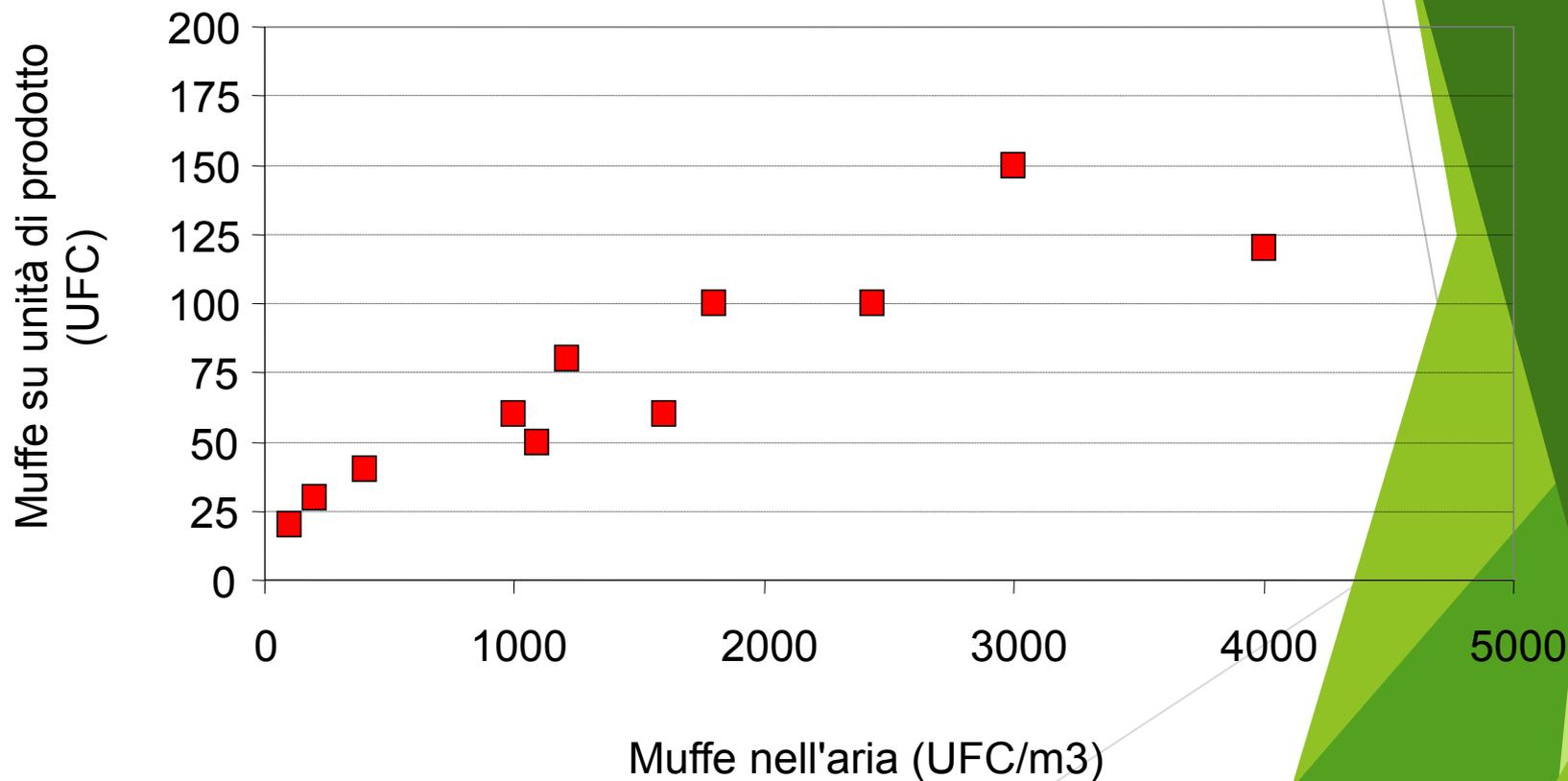
- Aria
- Sporco

Agenti: *Aspergillus* spp.



Relazione tra contaminazione aerea e alterazione del prodotto

Concentrazione di spore di muffe nell'aria e numero di colonie di muffe sul pane dopo 10 giorni a 25°C



Le alterazioni della pasta del formaggio

Gonfiore precoce	Coliformi Lieviti Lattobacilli eterofermentanti
Gonfiore tardivo	<i>Clostridium</i> <i>Propionibacterium</i>
Colorazioni anomale	<i>Bacillus</i> Coliformi
Marciume	Muffe <i>Clostridium</i> <i>Bacillus</i>



Le alterazioni della crosta del formaggio

Rammollimento	Coliformi <i>Bacillus</i> <i>Micrococcaceae</i>
Colorazioni anomale	<i>Bacillus</i> Coliformi
Marciume	Muffe <i>Clostridium</i> <i>Bacillus</i>



I patogeni del formaggio

Listeria monocytogenes

Salmonella

Escherichia coli

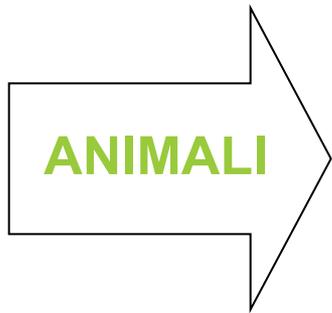
Mycobacterium

Brucella

Clostridium botulinum

Staphylococcus aureus

Fonti di contaminazione delle carni bovine, suine ed avicole



PELLE E
MUCOSE

Micrococcacus
Streptococcus

S. aureus

FECI

Enterobatteri
Enterococcus
Clostridium

E. coli patogeni
C. perfringens
Virus enterici
Salmonella
L. monocytogenes



SCUOIAMENTO

Micrococcus
Pseudomonas

Campylobacter
E. coli patogeni

EVISCERAZIONE

Enterobatteri
Bacillus

Salmonella
L. monocytogenes

TOILETTATURA

Clostridium

S. aureus

Conservabilità della carne

➤ **Temperatura**

➤ **Carica batterica iniziale (igiene di lavorazione)**

➤ **Superficie di contatto (macinazione)**

conservazione	alterazione	gruppo microbico
T < 5°C	superficiale, off-flavours, muco	<i>Pseudomonas, Acinetobacter, Moraxella</i>
T < 5°C	profonda, off-flavours, inacidimento	<i>Brochothrix thermosphacta</i>
T < 5°C, sottovuoto o AP	inacidimento,	<i>Lactobacillus Carnobacterium</i>
5°C < T < 15°C	superficiale, off-flavours	<i>Pseudomonas, Enterobatteri, Micrococcus</i>
5°C < T < 15°C	profonda, inacidimento, inverdimento, putrefazione	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Staphylococcus, Clostridium</i>

Prodotti derivati da carne

✓ **Conserve**

Carni in scatola

✓ **Semiconserve
di sale**

Prodotti carnei con aggiunta

✓ ***a taglio anatomico intero***

✓ ***insaccati***

Le alterazioni del salumi a taglio intero

Ammuffimento

Penicillium, Aspergillus, Alternaria, Cladosporium, Mucor

Viscosità superficiale

Brochotrix, Coliformi, Pseudomonas, batteri lattici

Putrefazione

Puzzo d'osso - bone taint

Clostridium, Bacillus, Sarcina
(prosciutto crudo)

Puzza di sacca - pocket taint

Vibrionaceae, Micrococceae

Puzza di costola - rib taint

(speck, bacon)

Inverdimento

Lactobacillus, Carnobacterium

Le alterazioni degli insaccati

Irrancidimento

Muffe, Sporigeni

Putrefazione

Clostridium, Bacillus, Sarcina

Rigonfiamento

***Clostridium*, coliformi,
b.lattici eterofermentanti**

Inverdimento

Lactobacillus, Carnobacterium

Inacidimento

***Brochotrix*, Coliformi, batteri lattici**

I patogeni

Listeria monocytogenes

Salmonella

Escherichia coli

Yersinia enterocolitica

Clostridium botulinum

Toxoplasma

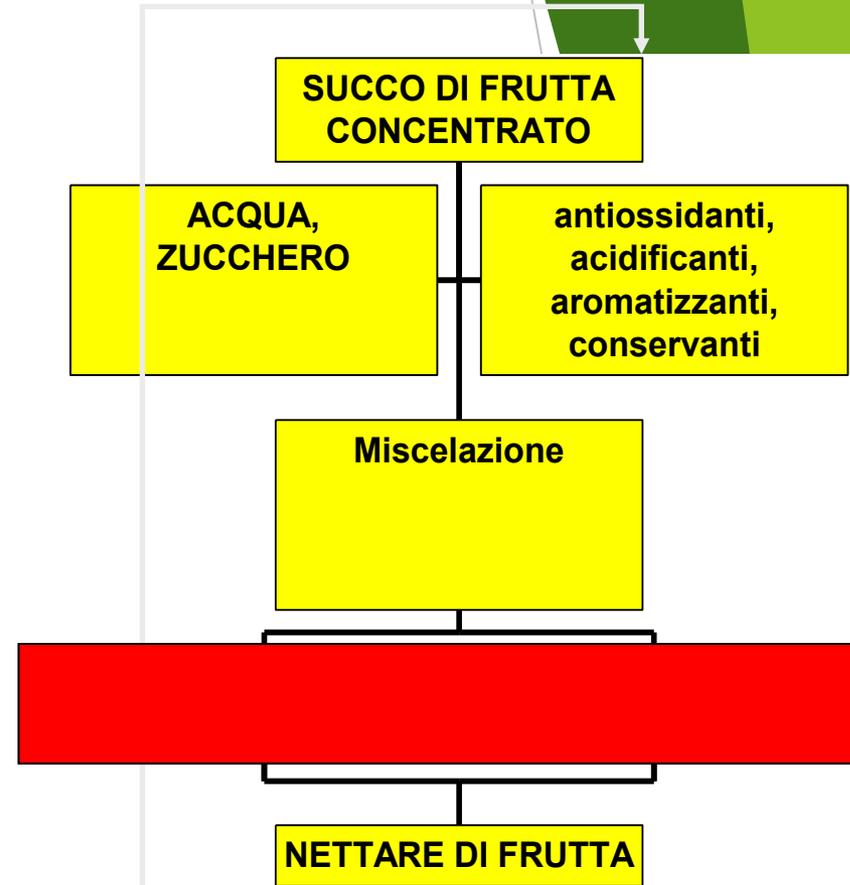
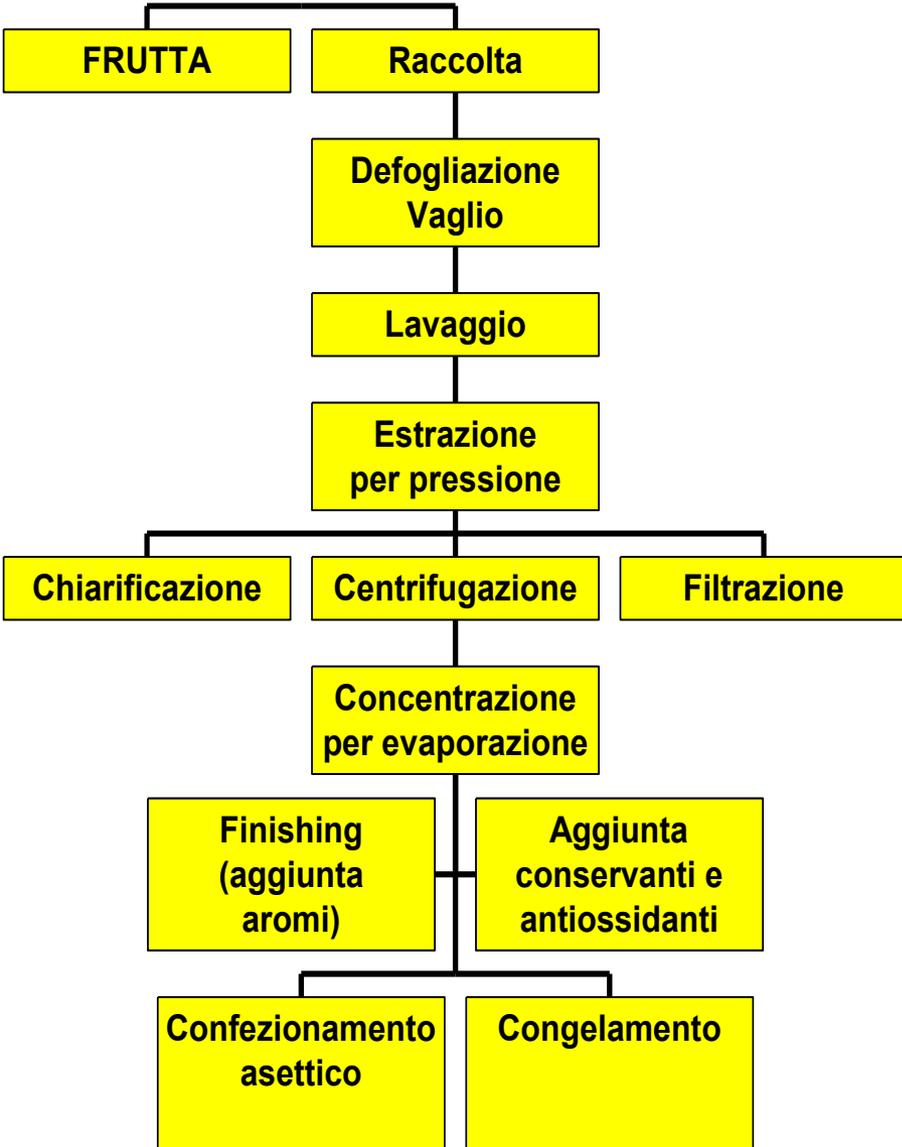
Helicobacter pylori

Bevande analcoliche

- **Succhi di frutta:** succhi estratti dalla frutta attraverso processi meccanici, fermentabili ma non fermentati, aventi odore, colore e sapore caratteristici della frutta da cui provengono.
- **Succhi di frutta concentrati:** succhi estratti dalla frutta concentrati per evaporazione sottovuoto. Congelati (Frozen Concentrated Orange Juice).
- **Nettari di frutta:** miscela di succhi di frutta o succhi di frutta concentrati o purea di frutta (40-50%) con acqua e zucchero.
- **Soft drinks:** miscela di succhi di frutta o succhi di frutta concentrati (min 12%), o altre essenze (té, cola, ginger) con acqua, zucchero. Addizionati di CO₂



Processo produttivo di nettare di frutta



Alterazioni microbiche dei succhi di frutta

Materie prime

Muffe *Aspergillus, Penicillium, Mucor, Cladosporium, Byssoclamys*

Lieviti *Candida, Dekkera, Debaryomyces, Hanseniaspora, Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces*

Batteri *Lactobacillus, Leuconostoc, Acetobacter, Gluconobacter*

Prodotti finiti

Muffe *Byssoclamys*

Lieviti *Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Zygosaccharomyces*

Batteri *Bacillus, Alicyclobacillus*

CONSERVE VEGETALI

▶ Semiconserva

- ▶ Prodotti che hanno subito un trattamento non drastico come la pastorizzazione;
- ▶ Si conservano a 0° C-12° C.

▶ Conserva

- ▶ Prodotti che hanno subito un trattamento di sterilizzazione. Si conservano in frigorifero solo dopo l'apertura.

Alterazioni microbiche in conserve vegetali

Batteri

Bacillus

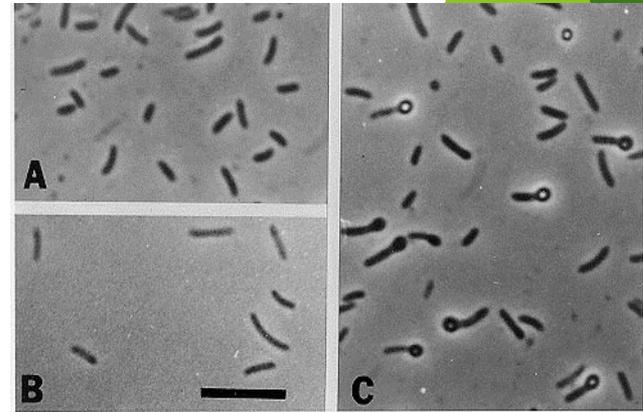
Clostridium



Patogeni in conserve vegetali

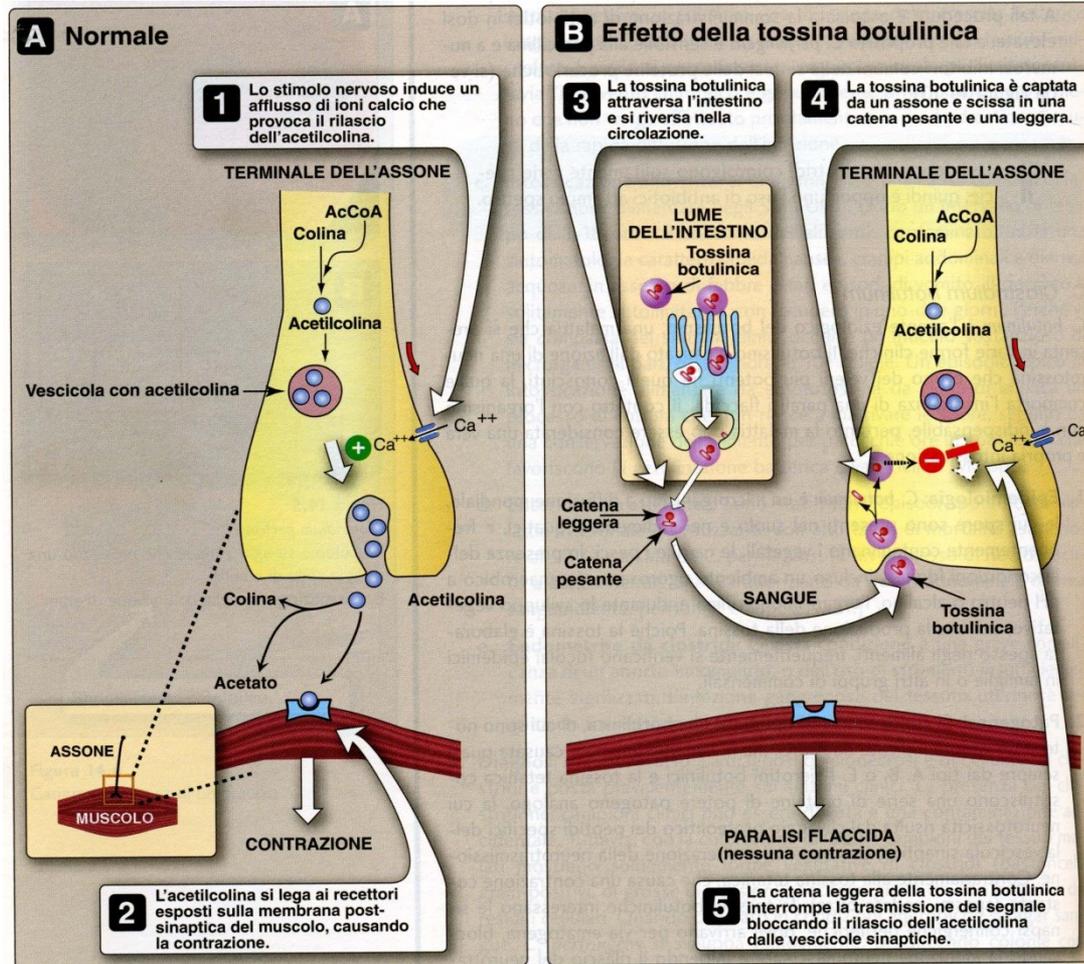
Batteri

Clostridium botulinum



Clostridium botulini

Batterio Bacillo G+, Anaerobi obbligati, **saprofita del suolo**, si tratta di una intossicazione data dall'ingestione di cibi contaminati, in cui il batterio moltiplicandosi ha prodotto la tossina. Malattia molto grave con alta mortalità causa **paralisi flaccida** bloccando la trasmissione dell'acetilcolina a livello della giunzione neuromuscolare.



EFFETTI contaminazione degli alimenti

- Degradazione caratteristiche organolettiche
- Pericoli salute consumatore

INTOSSICAZIONI ALIMENTARI

INFEZIONI ALIMENTARI

TOSSINFEZIONI ALIMENTARI

Infezione alimentare

Consumo di alimenti contaminati con microrganismi vivi e vitali, che una volta ingeriti nel lume intestinale si moltiplicano originando forme enterotossiche o enteroinvasive.

Intossicazione alimentare

Consumo di alimenti contenenti tossine prodotte da microrganismi presenti sull'alimento prima del consumo

Tossinfezione alimentare

Consumo di alimenti contenenti tossine e microrganismi. In questo caso la tossicità è data dalle tossine preformate sia da quelle prodotte all'interno dell'ospite, dalle cellule vive ingerite con l'alimento

Infezioni alimentari

Micr. riconosciuti,
patogeni

Salmonellosi

Shigellosi

Infezioni da *Vibrio
parahaemolyticus*

Gastroenteriti da
Campylobacter, *Yersinia
enterocolitica*,
Escherichia coli,

Brucellosi

Listeriosi

Virus

INTOSSICAZIONI BATTERICHE

```
graph TD; A[INTOSSICAZIONI BATTERICHE] --> B[Botulinica]; A --> C[Stafilococcica]
```

Botulinica

Stafilococcica

TOSSINFEZIONE

Ingestione sia di tossine che di batteri e spore

Clostridium perfringens

Clostridium botulini

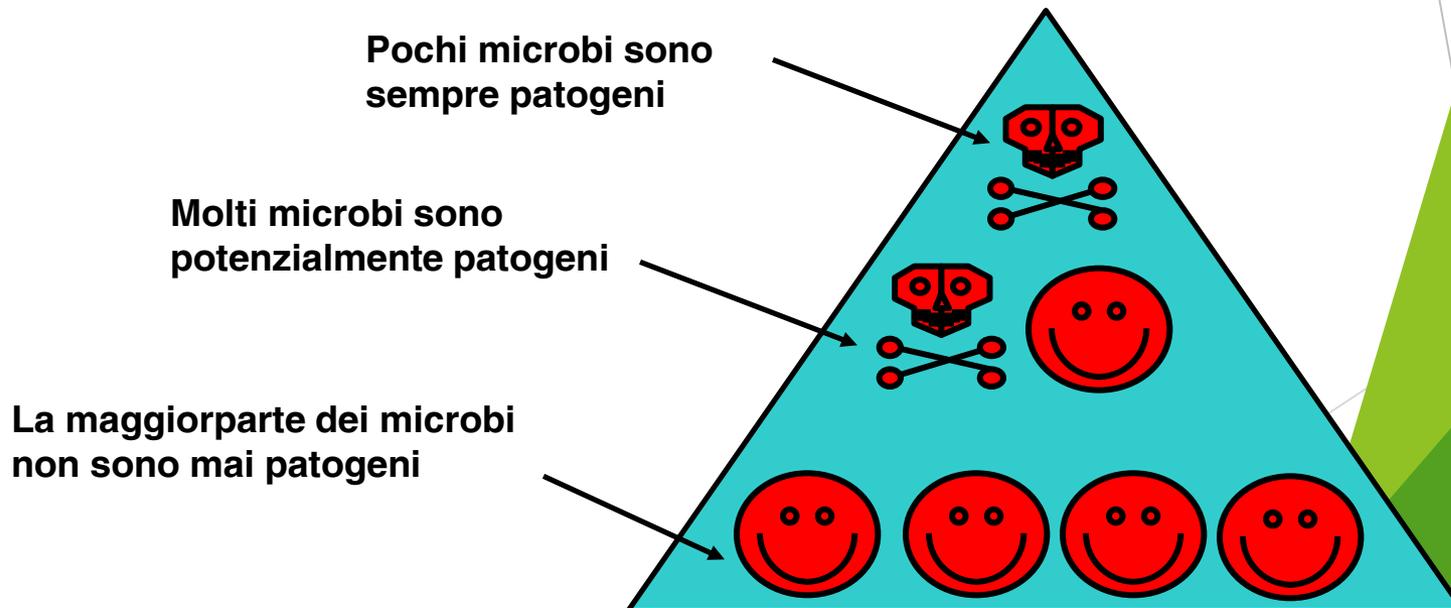
Clostridium difficile

Bacillus anthracis

Bacillus cereus

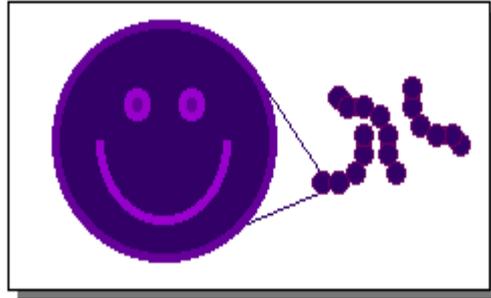
Non tutti i batteri causano malattia

Normalmente si pensa che tutti i batteri diano delle malattie, ma non è vero. Anzi, molti batteri sono utili per la nostra salute. Il terreno è ricco di batteri importantissimi per la biosfera (es. fissatori dell'azoto). Anche fra i batteri che causano malattie, pochi sono sempre patogeni. Alcuni lo sono soprattutto in individui immunocompromessi. Anche i batteri patogeni non sempre causano malattie.



La Flora Microbica Normale

The Normal Flora

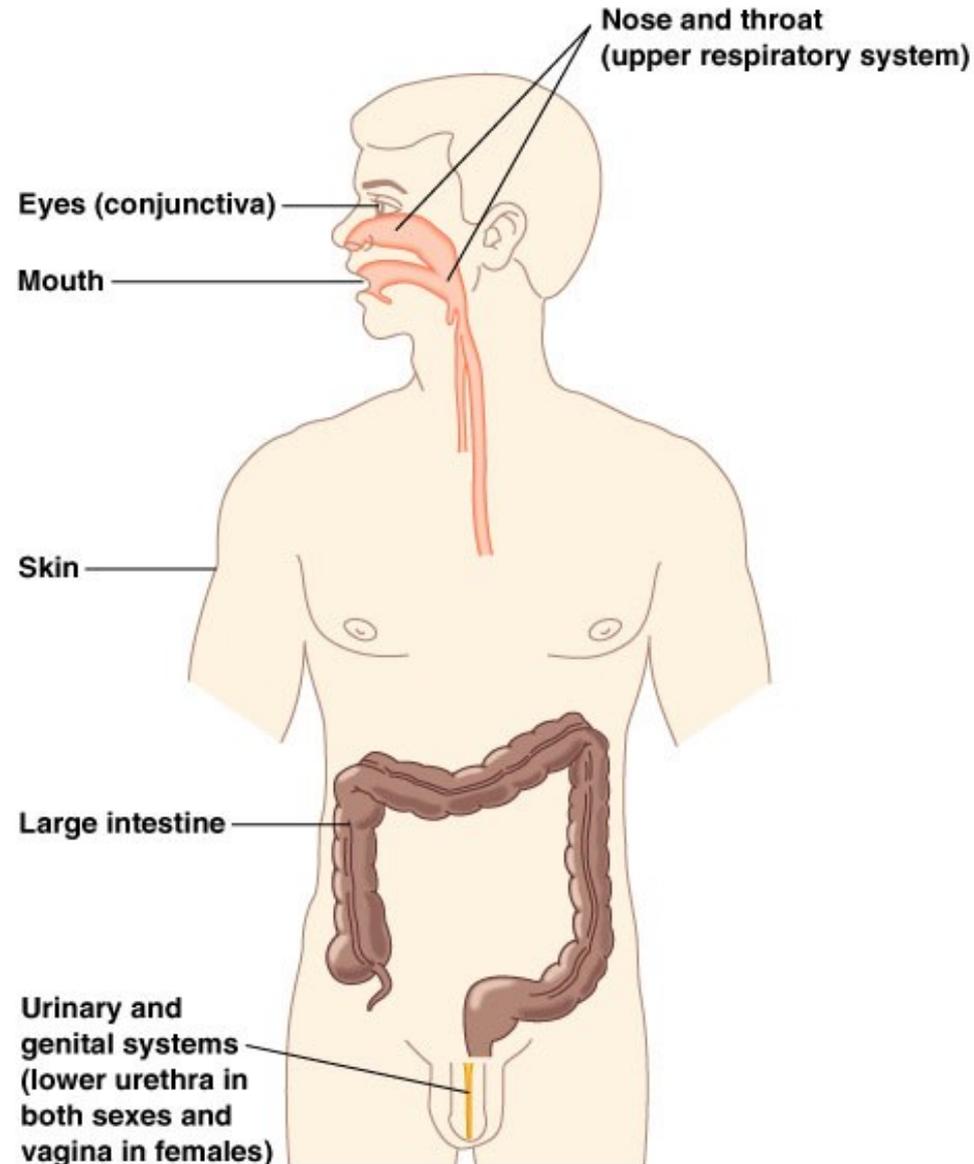


Il nostro corpo è colonizzato da moltissimi batteri. Si stima che abbiamo più cellule batteriche ($=10^{14}$) che cellule umane ($=10^{13}$). Di solito questa flora batterica vive sulla pelle e nell'intestino. La composizione di questa flora varia da persona a persona. A volte questi batteri possono diventare patogeni se acquisiscono fattori di virulenza (es. Escherichia Coli) o se vengono introdotti in siti sterili (es. Stafilococco Aureo).

Flora microbica normale

Microrganismi normalmente associati al tessuto sano.

Si trova soprattutto sulla pelle ($\sim 2 \text{ m}^2$) e sulle mucose (epiteli esposti indirettamente all'ambiente esterno, es. bocca, tratto gastrointestinale, app. respiratorio, ecc.) ($\sim 400 \text{ m}^2$).



Apparato tegumentario: prevalenza di **batteri aerobi o anaerobi facoltativi**, costituiti da **stafilococchi** (*Staphylococcus (Gram+) epidermidis*, altri stafilococchi coagulasi negativi,

talora anche *Staphylococcus aureus*), corinebatteri. Presenza anche di anaerobi stretti, in particolare *Propionibacterium acnes*.

Apparato respiratorio: i distretti di norma sterili sono la laringe, la trachea, i bronchi e gli alveoli polmonari. I distretti non sterili sono:

A) Cavità orale, l'orofaringe ed il rinofaringe nella quale si ritrovano molte specie diverse di **stafilococchi** e di **streptococchi (Gram +)** alfa e non emolitici, *Neisseriae* (, emofili,

actinomiceti, *Candida* prevalentemente della specie *albicans*, enterobatteri.

B) Fosse nasali: varie specie di stafilococchi e streptococchi, *Neisseriae*, emofili, corinebatteri.

Apparato gastro-enterico: i distretti sterili sono di norma l'esofago, lo stomaco, la maggior parte dell'intestino tenue, il peritoneo. I distretti non sterili sono:

A) Cavità orale.

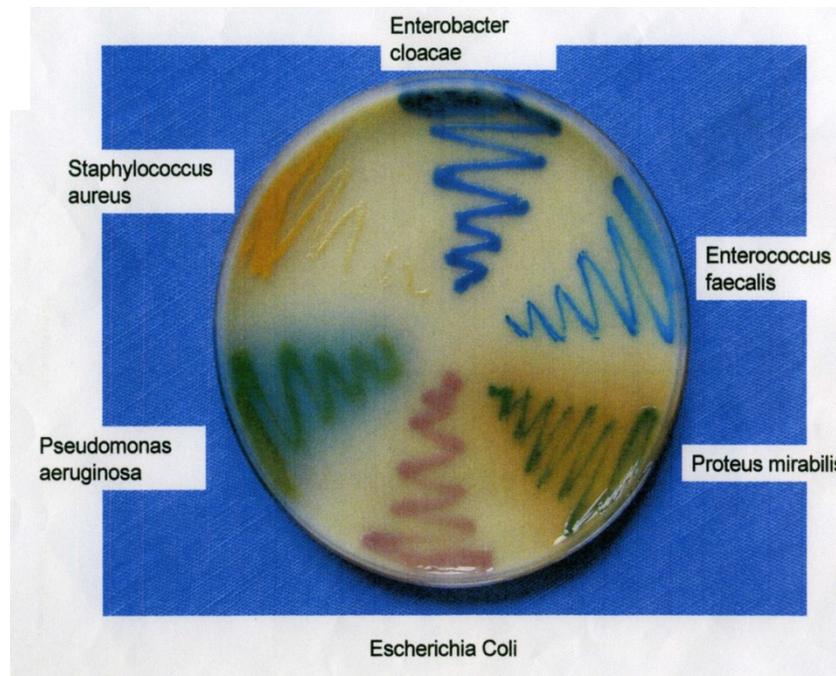
B) Intestino crasso e parte terminale dell'ileo, in cui dominano i **batteri anaerobi**, quali *Bacteroides*, *Prevotella*, fusobatteri, clostridi, **lattobacilli**, eubatteri, cocchi gram positivi. Tra gli anaerobi facoltativi troviamo gli **enterobatteri**, varie specie di stafilococchi e streptococchi, enterococchi.

Apparato genitale ed urinario: i distretti sterili sono di norma tutti gli organi interni quali gli organi riproduttivi maschili e femminili, la vescica gli ureteri ed i reni. I distretti non sterili sono:

A) Genitali esterni maschili e femminili, in cui sono presenti varie specie di **stafilococchi e streptococchi**, cocchi anaerobi, anaerobi strettissimi quali *Mobiluncus* e *Bacteroides*, corinebatteri, talora enterobatteri. Nella vagina la flora batterica varia considerevolmente secondo l'età del soggetto: è simile a quella cutanea nella pre-pubertà e nella menopausa, è costituita prevalentemente da varie specie di **lattobacilli** durante l'età fertile.

B) Uretra: con gli stessi germi di cui sopra e con presenza di micoplasmi.

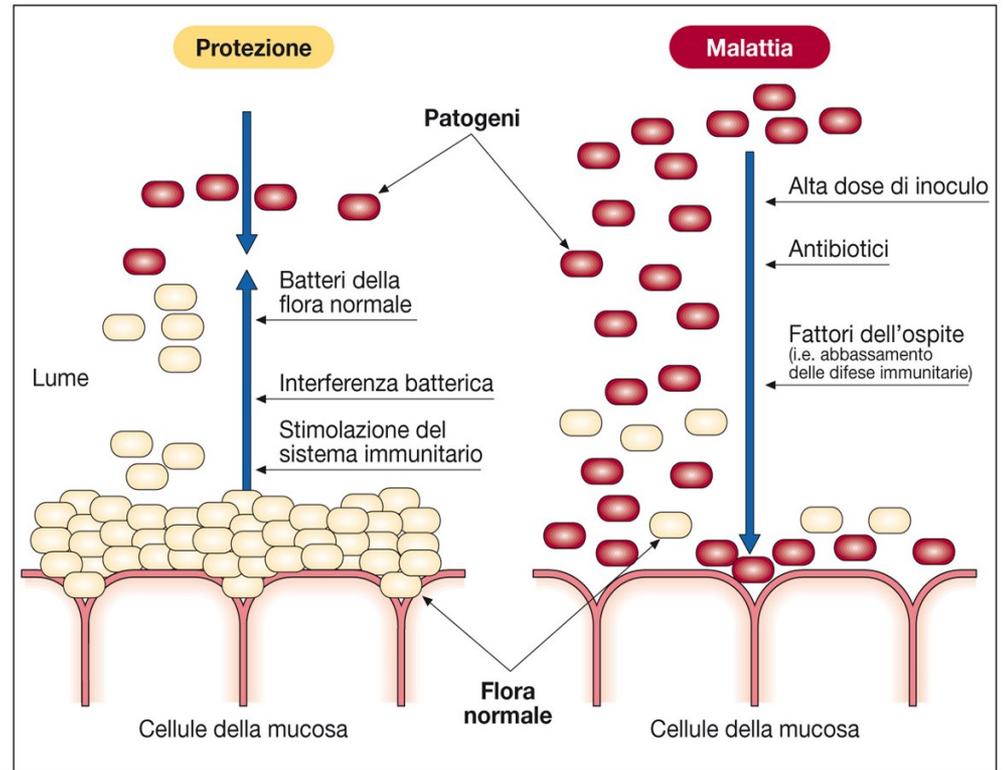
Urinary tract infections (UTI)



Distribuzione della flora microbica normale

Non c'è negli organi interni, sangue, sistema linfatico; microrganismi in queste sedi indicano di solito una malattia in corso. Intestino = contiene un enorme numero di batteri (~ 1/3 delle feci).

La flora normale è utile: previene la colonizzazione da parte di organismi patogeni, è responsabile di molte reazioni metaboliche, produce sostanze essenziali (es. vitamina K prodotta nell'intestino).



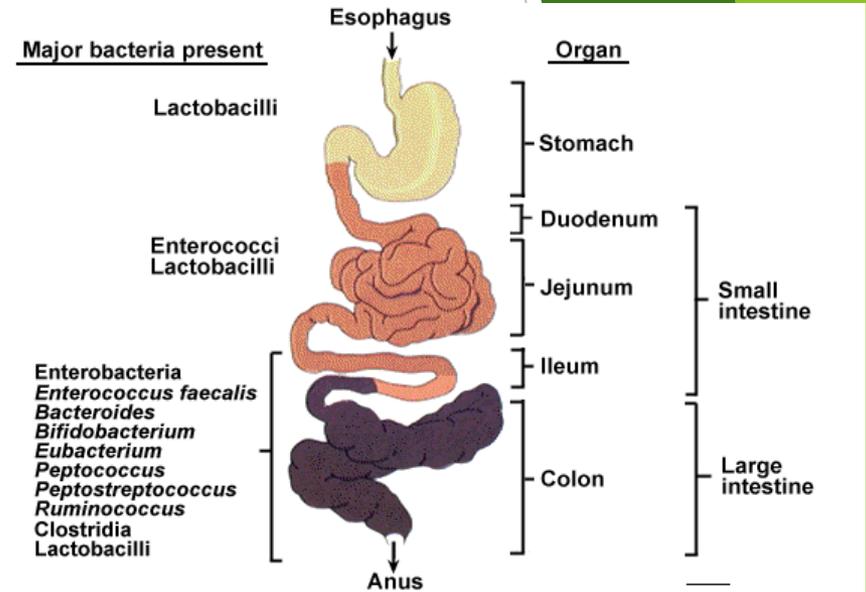
Gli antibiotici, oltre che i patogeni, inibiscono anche la flora normale → perdita dei batteri commensali → microrganismi opportunisti (es. *Stafilococco Aureo*, *Candida Albicans*) che normalmente non riescono a competere con la flora normale, possono crescere e dare malattie.

Flora microbica normale



Coltura da un tampone fatto su pelle sana

N.B. QUASI TUTTI I MICRORGANISMI POSSONO ESSERE TRASPORTATI TRANSITORIAMENTE CON LE MANI, ANCHE SE NON FANNO PARTE DELLA FLORA MICROBICA NORMALE DELLA PELLE.



Flora microbica normale del tratto digerente