



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

FACOLTA' DI
MEDICINA E CHIRURGIA

CORSO DI LAUREA IN
TECNICHE DELLA PREVENZIONE
NELL'AMBIENTE E NEI LUOGHI DI LAVORO

TITOLO DELLA TESI

Alterazioni cromatiche dei formaggi a pasta filata.
Aspetti giuridici.

Relatore: Candidato:

Prof. Roberto Petrucci Daniele Celenza

1253647

A/A 2011/2012

Alterazioni cromatiche dei formaggi a pasta filata. Aspetti giuridici.

Indice

Introduzione	<i>Pag.</i>	1
1 Le alterazioni degli alimenti	<i>Pag.</i>	2
2 Le alterazioni cromatiche dei formaggi freschi a pasta filata	<i>Pag.</i>	4
2.1 Microrganismi produttori di pigmento	<i>Pag.</i>	7
2.1.1 Pseudomonasspp.	<i>Pag.</i>	8
2.1.1.a. Fonti di contaminazione	<i>Pag.</i>	10
2.1.1.b. Patogenicità	<i>Pag.</i>	11
2.1.2 Altri microrganismi	<i>Pag.</i>	12
3 Pseudomonasspp. ed alterazioni dei formaggi freschi a pasta filata	<i>Pag.</i>	15
4 Significato della presenza di colorazioni anormali nei prodotti a pasta filata.	<i>Pag.</i>	19
5 Casi di mozzarella blu	<i>Pag.</i>	25
6 Conclusioni	<i>Pag.</i>	33
Bibliografia	<i>Pag.</i>	36

Introduzione.

Grande risalto mediatico ha avuto negli ultimi tempi il riscontro di prodotti lattiero caseari, in particolar modo mozzarella, con comparsa di aloni superficiali o chiazze circoscritte di colorito variabile dal roseo al blu più o meno intenso.

Il caso della mozzarella blu, è balzato agli onori della cronaca, nel corso del 2010: si trattava di mozzarella prodotta in Germania e commercializzata per la grande distribuzione (G.D.O.) con diversi marchi commerciali.

Successivamente le segnalazioni hanno riguardato anche prodotti lattiero caseari di produzione nazionale e locale. Ad inizio 2012 anche in Ciociaria, così come già era accaduto in altre zone d'Italia, si sono avuti casi di mozzarella blu.

Tali eventi, per niente isolati e talvolta eclatanti, hanno creato preoccupazione ed allarmismo tra i cittadini e nell'opinione pubblica anche se il reale significato dell'alterazione ai fini della sicurezza alimentare è di fatto inversamente proporzionale al clamore suscitato, ed il fenomeno della colorazione superficiale delle mozzarelle e dei prodotti alimentari più in generale è noto e studiato da parte della comunità scientifica.

Scopo del presente lavoro, tralasciando la descrizione puntuale delle diverse alterazioni degli alimenti, è quello di trattare le sole alterazioni cromatiche nei formaggi a pasta filata, il ruolo del tecnico della prevenzione nella raccolta delle evidenze, correlando gli aspetti giuridici e di responsabilità legati alla loro produzione e commercializzazione alla luce delle esperienze relative ai casi verificatesi nel corso dell'anno 2012 nel territorio della Provincia di Frosinone.

1. LE ALTERAZIONI DEGLI ALIMENTI.

Per Alterazione si intende una modifica negativa/peggiorativa delle caratteristiche organolettiche e/o nutrizionali di un alimento che lo rende inaccettabile per il consumo alimentare.

In seguito all'alterazione gli alimenti perdono l'aspetto, la consistenza, il profumo ed il sapore. Quale tipo di alterazione venga a predominare nel processo dipende soprattutto dalle caratteristiche chimico-fisiche dell'alimento ("*intrinsic factors*", fattori intrinseci). Questi fattori comprendono la qualità dei costituenti dell'alimento, il coefficiente di attività dell'acqua (valore di a_w), il pH, il potenziale redox e la struttura (consistenza).

Queste caratteristiche chimico-fisiche vengono influenzate a fondo dal processo di produzione dell'alimento ("*process factors*", fattori di processo). Altra importante influenza viene esercitata dalle condizioni di conservazione, soprattutto la temperatura, come pure l'umidità relativa e l'atmosfera gassosa del magazzino ("*extrinsic factors*", fattori esterni).

I suddetti fattori influenzano non solo il tipo, ma anche la velocità di deterioramento e di conseguenza la conservabilità dell'alimento stesso.

In linea generale quanto più elevata, per es., è la temperatura del magazzino, tanto più velocemente si altera l'alimento. Così, per es., la carne tenuta a temperatura ambiente (20 °C) si altera 10 volte più velocemente che a 0 °C.

Grande influenza sulla conservabilità ha la carica batterica iniziale dell'alimento. Quanto essa è minore, tanto maggiore è il tempo necessario ai microrganismi per raggiungere il numero di germi in grado di provocare alterazioni sensorialmente rilevabili. Ciò vale soprattutto alle temperature inferiori o sotto altre condizioni che allungano notevolmente il tempo di riproduzione dei microrganismi.

Gli alimenti, quindi, per loro natura, vanno incontro ad alterazioni causate da agenti di natura chimica, fisica e biologica, spesso concatenanti fra loro.

La maggior parte degli agenti alteranti pregiudica il valore merceologico dell'alimento attraverso:

- Peggioramento delle proprietà organolettiche;
- Commestibilità ridotta;
- Riduzione del valore nutritivo legato alle alterazioni biochimiche che modificano la composizione chimico-nutritiva dell'alimento e sono dovute all'azione di enzimi o alla semplice interazione chimica tra componenti organici dell'alimento;
- Riduzione del grado di salubrità per l'insediamento o incremento della popolazione microbica patogena che utilizza lo stesso alimento come substrato di crescita, o per la produzione di sostanze alteranti tossiche.

2. LE ALTERAZIONI CROMATICHE DEI FORMAGGI FRESCHI A PASTA FILATA.

Le alterazioni cromatiche sono un particolare tipo di alterazione caratterizzata dalla comparsa di zone più o meno estese e diffuse di pigmento.

Quelle della superficie e della pasta dei formaggi in generale originano da diverse cause. I difetti superficiali esse sono di norma legati alla crescita di microrganismi cromogeni (produttori di colonie colorate essi stessi o di pigmenti colorati) come eumiceti o anche *Pseudomonasspp.* responsabile di colorazione superficiale delle mozzarelle (Cabrini Neviani 1983). Più complessi sono invece i casi di pigmentazione della pasta (profonda), spesso in rapporto con il metabolismo proteico e con il taglio del formaggio e quindi a fenomeni ossidativi con il contatto dell'aria.

Giussani e Carini nel 1980 segnarono in mozzarelle con alterazione di gusto e odore dopo alcuni giorni dalla produzione, lo sviluppo di microrganismi: questi strisciati direttamente sul formaggio, posto in contenitori sterili e non completamente sommerso dal liquido di governo, dopo incubazione a 15 °C per 48-60 ore sviluppavano delle colorazioni nelle zone non ricoperte dal liquido, nonché la colorazione violacea del liquido stesso nel caso di ulteriore incubazione per altre 24-48 ore. Il ceppo fu identificato come *Pseudomonassynxantha*.

Cabrini e coll. (1983) in un'indagine microbiologica su mozzarelle che dopo alcuni giorni di conservazione presentavano odore putrido e sapore amaro osservarono che, oltre alla comparsa di sapori ed odori sgradevoli, si evidenziava sia sulla superficie che nel liquido di governo, la fluorescenza ai raggi UV..

Furono isolati ceppi appartenenti al genere *Pseudomonas* ed in particolare *P. Putida*, *P. fluorescens*, *P. palleronii* quali, essendo responsabili di un'intensa attività proteolitica e della produzione di pigmenti fluorescenti sono stati identificati come causa delle suddette alterazioni.

Fu inoltre riscontrato che il difetto riguardava il prodotti ottenuti attraverso un ciclo produttivo con acidificazione mediante acido citrico e si verificava in corrispondenza delle stagioni autunnali e primaverili. Secondo gli Autori i valori

di pH compresi tra 5,5 e 6, unitamente all'assenza di batteri lattici inibitori, nelle mozzarelle prodotte con acido citrico, facilitavano lo sviluppo di tale popolazione microbica.

Ulteriori analisi hanno evidenziato che il latte non era responsabile della contaminazione mentre le acque rappresentavano una notevole fonte d'inquinamento da *Pseudomonas*. Questi microrganismi psicotrofi, saprofiti delle acque e poco esigenti dal punto di vista nutrizionale, trovavano nelle mozzarelle un'ottima fonte di sostanze nutritive.

Rondinini e Garzaroli (1990) su mozzarelle con macchie puntiformi, di colore da giallo a bruno a rosso violaceo e odore sgradevole hanno isolato accanto ai batteri lattici, altri Gram negativi ed in particolare di *Pseudomonas*, provenienti dalle acque di lavorazione, e le Enterobatteriacee come *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Serratia*.

Gli autori conclusero che nelle mozzarelle il rischio maggiore era rappresentato dalla contaminazione secondaria che permetteva la crescita e la moltiplicazione di Gram negativi psicotrofi in grado di resistere a temperature di refrigerazione.

Soncini et al., 1998 in un episodio di colorazione rossa di mozzarelle hanno identificato come responsabili ceppi di *Pseudomonas aureofaciens* e *pseudomonas putida* biovar II.

Le esperienze citate convergono nella conclusione che nei formaggi freschi a pasta filata (mozzarelle) la contaminazione da ceppi appartenenti al genere *Pseudomonas* in grado di produrre pigmenti colorati, fluorescenti, piocianina e carotenoidi è causa delle alterazioni cromatiche che possono essere gialle, rossastre, verdi e blu.

TABELLA 1
CHIAZZATURE CROMATICHE SU ALIMENTI, CEPPI RESPONSABILI E FONTI DI ISOLAMENTO

<i>COLORAZIONE</i>	<i>BATTERI RESPONSABILI</i>	<i>FONTE DI ISOLAMENTO</i>	<i>NOTE</i>
GIALLO-BLU-VIOLA	<i>Ps. gessardii</i>	Acqua minerale naturale (Verhille, 1999; Peixet <i>al.</i> , 2009), acqua di processo (Cantoni <i>et al.</i> , 2006; Saraleet <i>al.</i> , 2010)	Responsabile di un caso di “coniglio blu” (Saraleet <i>al.</i> , 2010) e mozzarella con macchie giallo-violacee (Cantoni <i>et al.</i> , 2006)
GIALLO	<i>P. synxantha</i>	Latte amaro (Peixet <i>al.</i> , 2009)	Responsabile di casi di “latte giallo”
GIALLO-ARANCIO-ROSSO	<i>Ps. putida</i> biotipi A e B	Terreno, acqua di scorrimento superficiale (Peixet <i>al.</i> , 2009)	Sono più diffusi nell’ambiente che negli alimenti e non rivestono un ruolo importante come agenti di “spoilage”. <i>Ps. putida</i> responsabile di colorazione rosata sulla superficie di ricotte (Giaccone, 2010) e mozzarelle (Soncini <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Ps. chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i>	Superfici (Peixet <i>al.</i> , 2009)	
	<i>Ps. chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i>	Superfici (Peixet <i>al.</i> , 2009)	
ARANCIO CARICO	<i>Ps. aeruginosa</i>	Campioni clinici (Peixet <i>al.</i> , 2009) acqua minerale (Legnani <i>et al.</i> , 1999 Casanovas-Massana <i>et al.</i> , 2010)	Ha una bassa incidenza, sia nell’ambiente che negli alimenti
ARANCIO-ROSSO-BRUNO	<i>Ps. brassicacearum</i>	Vegetali - Brassicaceae (Peixet <i>al.</i> , 2009)	<i>Ps. Brassicacearum</i> responsabile di colorazione bruno-arancio sulla superficie di mozzarelle (Cantoni <i>et al.</i> , 2003)
ROSSO CUPO	<i>Ps. aeruginosa</i>	Campioni clinici (Peixet <i>al.</i> , 2009) acqua minerale (Legnani <i>et al.</i> , 1999 Casanovas-Massana <i>et al.</i> , 2010)	Ha una bassa incidenza, sia nell’ambiente che negli alimenti
GIALLO-VERDE	<i>Ps. Fluorescens biovar I e V</i>	Serbatoi di pre-filtro, fanghi attivi, alimenti (Peixet <i>al.</i> , 2009)	Responsabile di casi di “mozzarella blu”. La formazione del pigmento blu è favorita dalla presenza di ossigeno: ecco perché di norma gli alimenti contaminati cambiano di colore solamente in seguito all’apertura della confezione originale
BLU-VERDE	<i>Ps. Fluorescens biovar IV</i>	Serbatoi di pre-filtro, fanghi attivi, alimenti (Peixet <i>al.</i> , 2009)	Responsabile di casi di “mozzarella blu”. La formazione del pigmento blu è favorita dalla presenza di ossigeno: ecco perché di norma gli alimenti contaminati cambiano di colore solamente in seguito all’apertura della confezione originale
BLU	<i>Ps. libanensis</i>	Acqua di sorgente (Libano) (Dabboussiet <i>al.</i> , 1999; Peixet <i>al.</i> , 2009)	Responsabile di casi di “mozzarella blu” (Cantoni <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Ps. syncyanea</i>	Attualmente solo in ceppi di coltura (Peixet <i>al.</i> , 2009)	Responsabile di casi di “latte blu” (Vasutet <i>al.</i> , 2009)
	<i>Ps. tolaasii</i>	Funghi coltivati (Peixet <i>al.</i> , 2009)	Responsabile di casi di mozzarella blu. Patogeno per funghi coltivati.
BLU INTENSO	<i>Ps. aeruginosa</i>	Campioni clinici (Peixet <i>al.</i> , 2009) acqua minerale (Legnani <i>et al.</i> , 1999 Casanovas-Massana <i>et al.</i> , 2010)	Ha una bassa incidenza, sia nell’ambiente che negli alimenti
FLUORESCENZA	<i>Ps. fluorescens</i> <i>Ps. Aeruginosa</i> <i>Ps. chlororaphis</i> subsp. <i>Chlororaphis</i> <i>Ps. chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> <i>Ps. lundensis</i> <i>Ps. putida</i>	Ceppi isolati in latte pastorizzato Principali ceppi produttori di pigmenti (Franzetti <i>et al.</i> , 2007)	formaggio, mozzarella, sushi, carne ed insalata

(Fonte Aivemp 2011. Civera, Griglio, Marro, Piovesan, Testa ASL TO 5/Ce.I.R.S.A).

MICRORGANISMI PRODUTTORI DI PIGMENTO.

La colorazione superficiale dei formaggi freschi a pasta filata è quindi fenomeno essenzialmente di natura microbiologica, dovuto a batteri di origine ambientale i quali sono in grado di elaborare pigmenti di diversa natura chimica che rendono incommestibile l'alimento.

Questi pigmenti sono stati identificati in:

- **Fenazine**(Kerr e coll., 1999; Krastel e coll., 2002) – prodotti da parecchie specie di diversi generi batterici e comprendenti più di 50 varietà, ciascuna delle quali contiene un sistema anulare fenazinico.

Tra esse, due hanno colore blu; precisamente il metilfenazin-1-one, o **piocianina**, e la N-metil-1-idrossifenazina (Preetha e coll., 2010).

- **Carotenoidi**, i quali proteggono i microrganismi dalle radiazioni ionizzanti. Queste formano elettroni, radicali idrossilici e radicali idridici che sono capaci di alterare i biopolimeri, per esempio le proteine, i DNA e RNA. Una maggior pigmentazione dei batteri dovuta all'aumento della radiazione UV è avvertita per i batteri localizzati nell'acqua di superficie (Hermansson e coll., 1987).

Oltre a questi, alcune specie batteriche producono due particolari colori blu, meno frequenti rispetto a quelli dei due gruppi precedenti. I due pigmenti sono la glaucotalina e la indigoidina.

- **La glaucotalina** è un pigmento blu elaborato da *Rheinheimera baltica*, un microrganismo marino. La sua formula molecolare è $C_{34}H_{56}N_4O_4$ (p.m. 584,95) ma non è nota la sua struttura (Grossart e coll., 2009).

- La **Indigoidina** è un pigmento noto fin dal 1939 (Elazari-Volcani). Chimicamente è il 5-5'-diamino-4-4'-diidrossi-3-3-diazochinone 2-2.

Mentre le fenazine sono pigmenti solubili in acqua, le indigoidine non lo sono e la loro produzione è una proprietà variabile, perché la loro formazione è influenzata dalla composizione del terreno di crescita (Starr e coll., 1966; Kerr e coll., 1).

2.1.1. PSEUDOMONAS Spp.

Pseudomonasspp. sono batteri Gram negativi, mobili, aerobi e psicrotrofi, non producono spore e non sono resistenti al calore. Non crescono in substrati con pH inferiore a 4,5. Le *Pseudomonasspp.* fanno parte del genere *Pseudomonas*, famiglia: *Pseudomonadaceae*, ordine: *Pseudomonadales*, classe: Gamma *Proteobacteria*, phylum *Proteobacteria*.

Sono germi ubiquitari nell'ambiente e nei terreni coltivati, nel pulviscolo atmosferico e nelle acque di scorrimenti superficiali. Da questi habitats naturali *Pseudomonasspp.* si possono trasferire agli alimenti contaminandoli ed alterandoli.

Sono in grado di crescere in modo ottimale a 25°C, ma possono moltiplicarsi anche a temperature di refrigerazione (psicrotollerante), costituendo fino al 90% della flora microbica totale di un alimento (De Jonghe et al., 2010).

Alcune specie possono essere patogene per le piante (*Ps. pseudoalcaligenes*, *Ps. savastanoi*, *Ps. syringae*, etc.), altre per l'uomo, in special modo a seguito di infezioni nosocomiali (*Ps. aeruginosa*, *Ps. alcaligenes*, etc.) o per gli animali, soprattutto pesci e uccelli (*Ps. anguilliseptica*, *Ps. chloraphys*, *Ps. aeruginosa*).

Pur avendo la maggior parte di *Pseudomonasspp.* un'origine ambientale, negli alimenti si osservano spesso specie diverse a seconda del substrato. Nel latte, predominano ceppi appartenenti a *Ps. ludensis*, *Ps. fragi*, *Ps. fluorescens* e *Ps. gessardi* (Marchad et al., 2009; De Jonghe et al., 2010), spesso coinvolti non solo in alterazioni organolettiche legate all'attività di lipasi e proteasi, ma anche in grado di produrre varie piovveridine (Browne et Lucke, 2010).

Nelle carni, negli ambienti di lavorazione e in modo particolare nei laboratori di sezionamento e lavorazione carni, dominano invece *Ps. fluorescens* e *Ps. fragi*, che, grazie al catabolismo degli aminoacidi, determinano lo sviluppo di odori sgradevoli ammoniacali. *Pseudomonasfragi* (specie non pigmentante ma in grado di utilizzare la creatina e creatinina presente nelle carni) è la specie dominante nelle carni fresche alterate (Drosinos et Board, 1995).

Nel pesce invece vengono segnalate *Ps. aeruginosa* e *Ps. fluorescens*, che sono considerate specie patogene opportuniste per numerose specie ittiche (Angelino et Seigneur, 1988), *Pseudomonas putida*, che può indurre gravi infezioni nella trota, *Pseudomonas chloraphis* responsabile di setticemie in varie specie (Altinok et al, 2006). Tali specie, oltre a comportarsi come patogeni opportunisti, sono in grado di provocare alterazioni nell'alimento. Nelle insalate pronte al consumo si isola molto frequentemente *Pseudomonas. fluorescens*, seguito da *Pseudomonas putida* (Franzetti et al., 2007).

Alcuni ceppi producono pigmenti conferenti all'alimento contaminato colori innaturali come giallo, rosso, verde fluorescente e blu-viola.

Preetha e coll.(2010) hanno segnalato la produzione di un pigmento blu con struttura simile a quello della piocianina da parte di due ceppi di del gruppo di *Pseudomonas aeruginosa* (MCCB102 e MCCB103); *Pseudomonas aeruginosa* si è rilevata inoltre capace di sintetizzare piocianina e 1-idrossifenazina (Kerr e coll., 1999).

I Ceppi di *Pseudomonas fluorescens* individuati come capaci di elaborare piocianina appartengono ai seguenti biotipi (Stainer, 1966):

Biotipo A (I): *P. fluorescens* tipico

Biotipo B (II): *P. marginalis*, *P. tolaasii*

Biotipo C (III)

Biotipo D: *P. chlororaphis*

Biotipo E: *P. aureofaciens*

Biotipo F (IV): *P. lemmonieri*

Biotipo G: ceppi miscelanei di *P. geniculata* – incerta sedis.

I ceppi di biovar IV sono in grado di elaborare indigoidina .

2.1.1.a) Fonti di contaminazione.

Le *Pseudomonadaceae* sono presenti nel suolo, nelle acque di scorrimento superficiale e sui vegetali. Dato il loro carattere ubiquitario, possono quindi trasferirsi facilmente sui prodotti ortofrutticoli (specialmente se a foglia verde come le insalate), sugli animali di allevamento e nei prodotti derivati (carni, uova, latte).

In particolare, il latte in allevamento, attraverso il contatto con acqua contaminata, il terreno o biofilm presenti sulla superficie dei tank di refrigerazione (Cousin, 1982), può facilmente entrare in contatto con *Pseudomonasspp.* rappresentando successivamente una delle fonti di contaminazione per i prodotti lattiero-caseari a base di latte non trattato termicamente.

Finazzi et al., (2011) dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna hanno evidenziato un'elevata prevalenza (55%) di *Pseudomonasfluorescens* in campioni di latte crudo scelti casualmente, con livelli di concentrazione in alcuni casi considerevoli (6-7 log ufc/ ml).

La fonte più frequente di contaminazione degli alimenti è rappresentata dall'acqua di processo utilizzata durante le fasi di lavorazione e sulle superfici a contatto con gli alimenti.

Una volta introdotto nell'ambiente produttivo, per le scarse esigenze nutritive e la notevole capacità di adattamento, *Pseudomonas* risulta di difficile eradicazione. Può infatti sopravvivere per lunghi periodi grazie alla formazione di un biofilm protettivo. (Van DerKooij et al., 1982; Legnani et al., 1999),

Pseudomonasspp. è stato inoltre isolato anche in campioni di acqua minerale imbottigliata in Francia, Germania e Libano (Verhille et al., 1999), nelle acque di acquedotto in Italia e nelle acque potabili all'interno di edifici pubblici tedeschi (Völker et al., 2010).

Pseudomonasgessardii è stato indicato come causa di pigmentazione anomala (blu intensa) in carcasse di coniglio contaminate dall'acqua utilizzata per la

sanificazione delle superfici dell'impianto di lavorazione (Sarale et al., 2010 - Convegno Nazionale AIVI).

2.1.1.b) Patogenicità.

Non sono descritti, nell'uomo, a seguito del consumo di alimenti, casi di malattia riconducibili alle *Pseudomonadaceae* responsabili di variazioni cromatiche degli alimenti.

Pseudomonas spp., può essere a volte responsabile di infezioni post-trasfusionali e respiratorie in persone debilitate o con difese organiche compromesse (Gershman et al., 2008); in questo caso il ruolo prevalente appartiene a *Pseudomonas aeruginosa* particolarmente temuta nel campo delle infezioni ospedaliere.

Pseudomonas aeruginosa diventa concretamente patogena solo quando riesce a penetrare all'interno dei tessuti umani superando la barriera di cute o mucose (e quindi non per via alimentare), come capita nel caso di ustioni, per uso di cateteri urinari o endovenosi o a seguito di un calo delle difese immunitarie. I soggetti più a rischio risultano pertanto i pazienti ospedalizzati (Peix et al., 2009; Giaccone, 2010).

2.1.2. Altri microrganismi

I batteri produttori di pigmenti blu non appartengono solo alla famiglia delle *Pseudomonadaceae*; sono stati studiati anche i seguenti microrganismi:

Sinomonas Atrocyanea (Già Arthrobacter Atrocyaneus).

E' microrganismo aerobico e mesofilo. E' Gram variabile a seconda della fase di crescita come le caratteristiche morfologiche (aspetto e colore delle colonie, morfologia del ciclo bastoncino-cocco, mobilità, ecc.). Sintetizza il pigmento blu scuro indigoidina (Zhou e coll., 2009). E' compreso nel genere *Sinomonas*, famiglia *Micrococcineae*, subordine: *Micrococcineae*, ordine: *Actinoyicetales*, subclasse *Actinobacteridae*, classe *Actinobacteria*, phylum *Actinobacteria*.

E' presente nel suolo e nei vegetali sui quali non produce il pigmento.

Clavibacter Michaganensis Subsp. Insidiosum

(Sinonimi: *Corynebacterium insidio sum*, *Corynebacterium michiganense* pv. *Insidiosum*) *C. michiganensis* subsp. *Insidiosum* è un germe con forma di bastoncino, aerobico, Gram positivo, capsulato, immobile. Il microrganismo appartiene al genere *Clavibacter* con oltre tre sub. specie. Il genere fa parte della famiglia delle *Microbacteriaceae* subordine *Micrococcineae*, ordine *Actinomycetales*, phylum *Actinobacteria*.

Produce granuli caratteristici di color blu; è un microrganismo fitopatogeno specialmente per il pomodoro (cancro del pomodoro) e la patata (cancro della patata). L'ospite principale è l'erba medica, ma anche altre *Medicago* spp. possono venire infettate. Il patogeno è originario dal Nord America e si è diffuso in tutti i continenti.

Arthrobacter Polychromogenes

A. *Polychromogenes* è un microrganismo del genere *Arthrobacter*, famiglia *Micrococcaceae*, ordine *Actinomycetales*, phylum *Actinobacteria*. I batteri del genere *Arthrobacter* sono microrganismi a forma bastoncellare, Gram positivi non sporigeni. Mesofili, anche se alcuni ceppi risultano in grado di ben tollerare le

basse temperature. Sono batteri molto diffusi nel terreno e negli ambienti acquatici, in particolare possono contaminare i pesci di mare. Sono tutti alotolleranti o alofili, crescono a concentrazioni di sale variabili dal 5 al 15%, questa caratteristica può favorire lo sviluppo sulla superficie dei formaggi a crosta lavata come il Taleggio che nel corso della stagionatura vengono ripetutamente spazzolati e lavati con soluzioni saline. Formano spesso colonie cremose di colore arancio. *A. polychromogenes* elabora due pigmenti blu, l'indigoidina insolubile in acqua, e l'indocromo solubile in acqua (Knackmuss e coll., 1968).

DICKEYA DADANTII (ErwiniaChrysanthemi)

È un batterio fitopatogeno che può infettare frutti (banane, ananas) e vari alimenti vegetali come cipolle, carote, cardamoni, sedano, ravanelli, sorgo, patate dolci, pomodori, piante del tabacco e varie piante ornamentali.

Il microrganismo ha una diffusione mondiale. Il suo potere patogeno si esplica degradando le parti molli degli organi plantari tramite la secrezione di pectinasi e cellulasi.

D. dadantii è un enterobatteriaceo appartenente al genere *Dickeya*, famiglia Enterobacteriaceae, ordine Enterobacteriales, classe Gammaproteobacteria, phylum Proteobacteria.

D. dadantii è un batterio forte produttore di indigoidina (Starr e coll., 1966, Chu e coll., 2010).

Acinetobacter

Gli *Acinetobacter* sono batteri Gram negativi appartenenti al genere *Acinetobacter*, famiglia Moraxellaceae, ordine Pseudomonadales, classe Gammaproteobacteria, phylum Proteobacteria.

Sono germi aerobi non fermentati, la cui morfologia è molto variabile specialmente quella dei ceppi isolati da campioni clinici umani. Sono ampiamente diffuse in natura e possono sopravvivere su vari substrati (umidi e

secchi), negli ambienti ospedalieri, negli alimenti. Nell'acqua in bottiglia, quando presenti, si aggregano formando filamenti.

Acinetobacter sp. è in grado di produrre Il ceppo è stato isolato da liquami di fattorie.

VOGESELLA INDIGOFERA(PseudomonasIndigofera)

Vogesella indigofera è un microrganismo Gram negativo con forma di bastoncino. Aerobico, fa parte del genere *Vagesella*, famiglia *Neisseriaceae*, ordine *Neisseriales*, classe *Beta Proteobacteria*, phylum *Proteobacteria*. Il suo habitat naturale è l'acqua di fosso.

Rheinheimera Baltica

E' germe aerobico, Gram negativo, appartenente al genere *Rheinheimera*, famiglia *Chromatiaceae*, ordine *Chromatiales*, classe *Gammaproteobacteria*, phylum *Proteobacteria*.

I germi del genere *Rheinheimera* sono stati isolati da vari ambienti marini e lacustri. La caratteristica più evidente di *Rheinheimera baltica* è la produzione di un pigmento di colore blu intenso (profondo blu), denominato claucotalina.

La produzione del pigmento è influenzata da condizioni ambientali come le interazioni con altri batteri presenti (Bode, 2006; Grossart e coll., 2009).

E' considerato come germe ambientale senza conseguenze su alimenti ittici o altro.

StreptomycesAureofaciens

Batteri Gram positivi con habitat originario nel suolo.

. Appartengono al genere *Streptomyces* famiglia *Streptomycetaceae*, ordine *Actinomycetales*, phylum *Actinobacteria*. Due specie, lo *Streptomyces aureofaciens* ceppo CCM3239 e lo *Streptomyces lavendulae* biosintetizzano il pigmento blu indigoidina.

Sono germi ambientali e solo occasionalmente possono contaminare gli alimenti senza riprodursi. Si isolano sul terreno agar asparagina.

3. PSEUDOMONASSPP. E ALTERAZIONI NEI FORMAGGI FRESCHI

A PASTA FILATA

I batteri del genere *Pseudomonas* sono in grado di provocare negli alimenti numerosi fenomeni alterativi: le alterazioni più comuni consistono nella modificazione dell'aroma e del sapore del prodotto che può diventare amaro o assumere odori di sapone, fruttato, patata o cherosene.

Nel caso del latte ed i suoi prodotti derivati, le lipasi prodotte da questi microrganismi possono causare comparsa di sapore amaro, di odori atipici e di rancido (Wiedmann et al., 2000; Doyle et al., 2001; Dogan et Boor, 2003; Giaccone, 2010), mentre le proteasi, degradando la caseina, conferiscono un colore grigiastro, sapore amaro e gelificazione dei prodotti UHT (Datta et al., 2001). Inoltre tali enzimi possono determinare difetti di struttura, quali rammollimento e colliquazione.

Alcuni ceppi, proliferando nelle matrici alimentari, possono produrre pigmenti fluorescenti e/o colorati, piocianina e carotenoidi che conferiscono all'alimento colorazioni innaturali (giallo, rosso, verde fluorescente o blu-viola).

Nel caso delle mozzarelle la capacità di produrre il pigmento non sembra essere influenzata né da variazioni di pH (comprese tra 5.1 e 6.5), né da diversità del processo di lavorazione (per esempio mozzarelle ottenute con acidificazione citrica o con acidificazione lattica), né da un livello minimo di concentrazione del microrganismo (Finazzi et al., 2011) o dalla temperatura di conservazione dell'alimento.

I principali ceppi produttori di pigmenti fluorescenti all'interno del genere *Pseudomonas* risultano *Ps. fluorescens*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. lundensis*, *Ps. putida*, *Ps. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* e *Ps. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* (Gennari et Dragotto, 1992; Giaccone, 2010).

Altre specie "fluorescenti" di *Pseudomonas* indicate da Baida (et al., 2001) sono state isolate nel corso di varie ricerche dalle acque e comprendono *Ps. veronii*, *Ps. rhodesiae*, *Ps. gessardii*, *Ps. migulae*, *Ps. mandelii*, *Ps. libanensis*, *Ps. cedrellae*, *Ps. orientalis*. Solo *Ps. aeruginosa* risulta produttrice di piocianina.

Nel 2008, Bevilacqua (et. al, 2008) ha analizzato alcuni campioni di mozzarelle acquistate al dettaglio. Trasferite in condizioni di refrigerazione, sono state poi

conservate ad una temperatura di abuso termico (+ 15°C) per 3 giorni. La caratterizzazione della microflora autoctona delle mozzarelle e del loro liquido di governo ha evidenziato la presenza di Pseudomonadaceae che, partendo inizialmente da 10⁵ufc/g ha registrato un incremento fino a 10⁸ufc/g. L'identificazione dei ceppi di *Pseudomonas* ha messo in evidenza la presenza di *Ps. fluorescens*, ritenuta responsabile dei fenomeni di alterazione osservati successivamente sul prodotto.

Ps. fluorescens inoculato sperimentalmente si moltiplica con velocità simile sia nelle mozzarelle che nel liquido di governo (dev.st.< 0.3) fino al raggiungimento della fase di plateau (concentrazioni di circa 8- 9 unità logaritmiche) che viene raggiunta in tempi differenti a seconda delle temperature di conservazione: circa 5 giorni se i campioni vengono conservati a 8°C oppure 1-2 giorni se conservati a 15 e 20°C (Finazzi et al., 2011).

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana nel periodo compreso tra giugno ed agosto 2010, su 26 campioni di mozzarelle oggetto dell'allerta attivata in seguito ad una segnalazione di "mozzarella blu", di cui 17 reperti provenienti da esposti di privati cittadini, e altri 9 campioni prelevati ufficialmente presso la grande distribuzione (Bogdanova et al., 2010) ha isolato in 16 casi *Pseudomonas* spp.; in particolare in 14 campioni di mozzarella è stato isolato *Ps. fluorescens* ed in due è stato isolato *Ps. aeruginosa*.

Ps. fluorescens è stato isolato ad alti titoli in tutti i campioni pervenuti alterati nel colore (in media > 10⁷ufc/g) e in 3 campioni reperto con confezioni integre e non alterati al momento dell'apertura in laboratorio, ad eccezione di un solo campione in cui è stato isolato *Ps. aeruginosa*. Tali risultati mettono in evidenza che *Pseudomonas* può essere normalmente presente nel prodotto originale anche a titoli elevati (> 10⁶ufc/g) e che quindi sia le condizioni di conservazione che soprattutto la lunga shelf-life possono consentire la sua moltiplicazione ed eventualmente la comparsa di colorazioni anomale.

Sempre l'I.Z.S. delle Regioni Lazio e Toscana ha accertato come sul tavolo del consumatore possano arrivare prodotti non alterati organoletticamente, ma con caratteristiche igieniche non adeguate che possono peggiorare quando tale tipologia di prodotto venga consumata in prossimità della scadenza.

Su 25 campioni di fiordilatte prelevati presso la grande distribuzione durante il loro periodo di shelf-life ed analizzati entro 24 ore dall'acquisto, nessuno ha presentato alterazioni organolettiche visibili nel colore, consistenza ed odore all'apertura della confezione: in 16 dei 25 campioni esaminati sono stati rilevati titoli di *Pseudomonas* spp. da $3,3 \times 10^3$ a $2,6 \times 10^6$ ufc/ g. Complessivamente sono stati isolati 10 ceppi di *Ps. fluorescens*, 5 di *Ps. putida* e 3 di *Ps. aeruginosa*.

Tra i campioni risultati positivi per *Pseudomonas* spp., durante il periodo di conservabilità indicato dal produttore, 4 campioni hanno sviluppato una lieve colorazione giallastra accompagnata da fluorescenza, rilevata con la lampada di Wood. In tutti questi casi, l'unica specie isolata è stata *Ps. fluorescens*, a titoli variabili tra 10^3 e 10^6 ufc/ g. Nessun campione ha presentato una colorazione blu (Bilei et al., 2010).

De Jonghe et al., 2011 hanno dimostrato come, negli allevamenti di vacche da latte, la differenza di crescita di *Pseudomonas* spp. in condizioni di stoccaggio ottimali a confronto con condizioni sub-ottimali sia statisticamente significativa già all'interno del tank di refrigerazione del latte.

Questi microrganismi psicrotolleranti possono essere in grado di produrre proteasi e lipasi extracellulari termostabili, in grado di causare successivamente alterazioni e difetti strutturali in latte e prodotti a base di latte pastorizzato o trattato con alte temperature (UHT).

Gennari e Dragotto, 1992 hanno esaminato la microflora di 182 campioni prelevati da alimenti, sia freschi che alterati, terreni e acque superficiali. L'86% di essi è risultato positivo per la presenza di specie con caratteristiche di fluorescenza appartenenti al genere *Pseudomonas*, di cui il 65,4% identificato come *Ps. fluorescens*.

Le concentrazioni batteriche medie in grado di provocare fenomeni alterativi negli alimenti si sono attestate su valori superiori a 10^6 - 10^7 ufc/g: i campioni in evidente stato di alterazione hanno raggiunto cariche di 10^8 - 10^{11} ufc/g (10-40% della popolazione microbica totale) per la carne e di 10^5 - 10^7 ufc/ cm² (1-10% della flora totale) per il pesce.

I biotipi e sottogruppi delle specie di *Pseudomonas* maggiormente isolati, sia negli alimenti che nell'ambiente, appartenevano tutti a ceppi produttori di pigmenti fluorescenti.

4. SIGNIFICATO DELLA PRESENZA DI COLORAZIONE ANOMALA NEI PRODOTTI A PASTA FILATA.

Negli ultimi anni la tecnologia di produzione dei formaggi freschi ha assunto un ruolo primario: l'automazione del processo e l'innovazione del packaging, hanno permesso il mantenimento delle caratteristiche sensoriali del prodotto mentre l'applicazione del sistema HACCP e dei sistemi certificati di qualità ha consentito di standardizzare lo stato igienico, qualitativo e la shelf-life del prodotto.

Ciò nonostante i rischi di contaminazione microbica secondaria non sono da sottovalutare poiché, anche nel caso in cui esse non sono nocive per l'uomo, modificano le qualità organolettiche ed igieniche del prodotto abbreviandone la vita commerciale.

E' evidente quindi che le industrie lattiero-casearie siano interessate a capire come impedire e limitare lo sviluppo dei microrganismi psicrotrofi e come individuare i meccanismi di azione di questi batteri in relazione al tipo di acidificazione scelta e, di conseguenza, all'ambiente microbico antagonista.

I formaggi a pasta filata sono quelli per produrre i quali, la cagliata, ricavata dalla coagulazione presamica acida delle caseine del latte, viene messa in acqua calda a 80-90°C, tirata (filata) con le mani o con mezzi meccanici e modellata; freschi in quanto non sottoposti a stagionatura, con un tasso di umidità superiore al 60°, immessi rapidamente al consumo, con una durata commerciale tradizionalmente di pochi giorni.

Tali formaggi devono essere prodotti in stabilimenti "riconosciuti" cioè in possesso di bollo CE e con ambiti di commercio in tutta l'Unione ; unica deroga per i caseifici annessi a punti vendita al dettaglio, e che hanno produzione limitata e locale (provincia e province limitrofe) che devono comunque essere "registrati".

In Italia per i formaggi freschi a pasta filata c'è l'obbligo del confezionamento all'origine (Dlgs 109/92 e succ. Modd.) proprio per garantire in ogni fase qualità e

sicurezza igienico sanitaria.

Secondo l'art. 1, comma 2, il prodotto alimentare preconfezionato è "l'unità di vendita destinata ad essere presentata come tale al consumatore ed alle collettività, costituita da un prodotto alimentare e dall'imballaggio in cui è stato immesso prima di essere posto in vendita, avvolto interamente o in parte da tale imballaggio, ma comunque in modo che il contenuto non possa essere modificato senza che la confezione sia aperta o alterata".

Nel caso dei formaggi a pasta filata, gli imballaggi utilizzati sono in genere vasi in materiale plastico, chiusi e sigillati, o buste di plastica termosaldate, contenenti il prodotto immerso in liquido di governo. Sono anche molto usati involucri sigillati di plastica o carta, dotati di fori e microfori in modo tale da poter sgocciolare il prodotto, presentato immerso in liquido di governo, pesandolo al momento della vendita al consumatore.

Il preconfezionamento, secondo la circolare del ministero dell'industria del commercio e dell'artigianato n. 150 del 16/01/1996, è "stato voluto dal legislatore a tutela del consumatore, consentendo che i formaggi in parola venissero consegnati con le indicazioni di etichettatura necessarie per conoscere, in particolare, il luogo di produzione, lo stato di freschezza attraverso la data di scadenza e il nome del produttore".

Si tratta di motivazioni anche di natura commerciale e merceologica, che trovano una seria ragione nella tutela dei prodotti DOP.

Pertanto il preconfezionamento protegge il contenuto da contaminazioni microbiologiche, dovute alla manipolazione del prodotto sfuso o al contatto con altri alimenti sfusi posti nello stesso banco espositore (contaminazioni crociate).

Ciò nonostante, proprio il tipo di presentazione del prodotto, l'obbligo di confezionamento associato alla immersione nel liquido di governo, può favorire il manifestarsi delle alterazioni cromatiche.

Infatti la contaminazione del liquido di governo, soprattutto se associato a cattive e non adeguate condizioni di conservazione, è la causa più frequente di sviluppo dei microrganismi cromogeni quali *Pseudomonas* e lieviti.

Il loro sviluppo può essere ricondotto alle seguenti evenienze:

1. Inquinamento del liquido di governo nelle fasi di produzione;
2. Contaminazione successiva durante la commercializzazione, nel caso di confezioni forate in uso nella distribuzione a banco;
3. contaminazione domestica;

tutte sempre associate a condizioni di non adeguata conservazione; infatti *Pseudomonas* spp. è un batterio in grado di crescere in modo ottimale a 25°C, ma riesce a moltiplicarsi anche a temperature di refrigerazione (psicrotolleranti). Questa condizione molto selettiva può comportare una sovracrescita esponenziale del microrganismo in fasi di successivo abuso termico durante la commercializzazione ed in ambito domestico rappresentando fino al 90% della flora microbica totale di un alimento (De Jonghe et al., 2011).

Una volta acquistato e trasportato a casa l'alimento, durante la conservazione domestica i microrganismi alteranti possono rapidamente svilupparsi, sia in confezioni integre che, soprattutto, dopo l'apertura, prendendo rapidamente il sopravvento sulla flora lattica termofila che non è in grado di svilupparsi a temperature di refrigerazione.

Trattandosi di un microrganismo non patogeno per via alimentare, *Pseudomonas* non è stato sino ad oggi preso in considerazione nella legislazione Europea e Nazionale e non sono stabiliti limiti di accettabilità negli alimenti. Il solo riferimento normativo inerente *Pseudomonas* è contenuto nel Dgls n. 31 del 2001 che, pur non considerando *Pseudomonas* spp. tra i criteri di potabilità delle acque destinate al consumo umano, richiede l'assenza di *Ps. aeruginosa* nelle acque messe in vendita in bottiglie o contenitori.

Nell'ambito dell'ordinamento nazionale, l'effetto della contaminazione da *Pseudomonas* degli alimenti, cioè la colorazione anormale, è considerato nella Legge 30 aprile 1962 n.283, "Disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande" il cui art. 5, a valenza penale, prescrive che:

"E' vietato impiegare nella preparazione di alimenti o bevande, vendere, detenere per vendere o somministrare come mercede ai propri dipendenti, o comunque distribuire per il consumo sostanze alimentari:

a) private anche in parte dei propri elementi nutritivi o mescolate a sostanze di qualità inferiore o comunque trattate in modo da variarne la composizione naturale, salvo quanto disposto da leggi e regolamenti speciali;

b) in cattivo stato di conservazione

c) con cariche microbiche superiori ai limiti che saranno stabiliti dal regolamento di esecuzione o da ordinanze ministeriali (4/a);

d) insudiciate, invase da parassiti, in stato di alterazione o comunque nocive, ovvero sottoposte a lavorazioni o trattamenti diretti a mascherare un preesistente stato di alterazione;

....”.

La presenza di macchie pigmentate nei formaggi freschi a pasta filata rientra quindi nella fattispecie prevista dall'Art. 5 lettere b) e d) della legge 283 del 30 aprile 1962 .

Non è possibile ipotizzare il reato previsto dall'Art. 444 del c.p. (prodotto nocivo) in quanto, nel solo caso della colorazione anormale, i microrganismi chiamati in causa (*Pseudomonas* spp) non sono patogeni e concretamente non in grado di determinare un danno per il consumatore.

Un'altro aspetto da considerare in caso di commercio di simili prodotti, è rappresentato dalla difficoltà di attribuire la specifica responsabilità del fatto, in quanto è difficile risalire al momento preciso della contaminazione.

Infatti i microrganismi interessati sono ubiquitari e veicolati dall'ambiente in cui sono prodotti, conservati o dai liquidi di governo ottenuti con acque in cui essi sono presenti: poiché, come visto, la legislazione comunitaria e nazionale non considera lo *Pseudomonas* come contaminante da monitorare, la sua presenza nelle acque utilizzate ai fini alimentari non è considerata come illecito.

Inoltre l'uso di liquidi di governo (salsetta) a bassa concentrazione salina per ottenere prodotti dal gusto delicato, non garantisce un adeguato contrasto allo sviluppo del germe, tanto più che oggi la mozzarella, tradizionalmente consumata fresca entro le 48 ore dalla produzione, ha periodi di shelf-life fino anche a 30 giorni.

Il tutto, se associato a shock termici possibili durante le fasi di distribuzione e

commercializzazione, può determinare il suo sviluppo con la produzione di colorazione, se sono interessati le biovarianti produttrici di pigmento.

Alla luce delle conoscenze ed evidenze descritte, nel caso in cui sia possibile dimostrare l'assenza di una contaminazione post-produzione (involucri sigillati e non forati) e di shock termici durante le fasi di distribuzione e commercializzazione, attraverso la verifica delle azioni in autocontrollo dei soggetti interessati, la responsabilità è da attribuire direttamente al produttore, in quanto egli è responsabile della qualità igienica, organolettica e nutrizionale del prodotto fino alla data di scadenza, che è da lui definita sulla base delle proprie valutazioni sul prodotto (valutazioni di shelf-life).

Nel caso invece di evidenti condizioni di conservazione non idonee, "shock termici" in una qualsiasi fase successiva alla produzione, la responsabilità ricade invece sul soggetto cui è affidata la responsabilità di quella fase, ad esempio:

- a) trasporto a temperatura superiore ai limiti di legge: responsabilità del trasportatore;
- b) esposizione per la vendita a temperatura superiore a 4°C o a temperatura ambiente: responsabilità del dettagliante.

Nel caso infine che le alterazioni si manifestino in ambito domestico, a distanza di tempo rispetto l'acquisto e l'apertura della confezione, il fenomeno è da ricondurre:

- a) temperature elevate della conservazione nel frigorifero domestico;
- b) contaminazione del prodotto aperto all'interno del frigorifero.

In questi casi la fattispecie non riveste carattere penale e/o di illecito amministrativo in quanto verificatasi post-vendita senza responsabilità degli O.S.A. interessati.

Nell'ambito delle evenienze descritte, sia dal punto di vista squisitamente tecnico-sanitario, per la valutazione dello stato igienico del prodotto e della sua pericolosità per il consumatore, sia della complessa valutazione degli aspetti di carattere amministrativo e/o penale che le stesse rivestono, il tecnico della prevenzione nell'ambito della propria appartenenza a servizi operanti ai fini della salute pubblica e caratterizzati da spiccata multidisciplinarietà, e dei compiti e funzioni definiti dal Decreto Ministeriale del 17 gennaio 1997 n.58, svolge un ruolo di primaria importanza soprattutto laddove, in virtù della qualifica di U.P.G. ai sensi degli artt. 55, 56 e 57 del C.P.P., è chiamato a valutare, in base alle evidenze raccolte, i diversi profili di responsabilità in ordine ai casi di prodotti alimentari non conformi.

E' inoltre da considerare come la attendibilità degli esiti di laboratorio nei casi di prodotti alimentari alterati, sia strettamente vincolata e dipendente alla buona esecuzione del campionamento, attività questa specificatamente nelle competenze professionali della figura del tecnico della prevenzione.

La non corretta individuazione delle matrici da campionare, o ancora la non corretta esecuzione delle procedure di campionamento e delle successive fasi di gestione del campione, è tale da determinare formalmente e sostanzialmente la non attendibilità dei risultati, e condizionare gli atti successivi, relativi finanche all'attribuzione di responsabilità e di formulazione di ipotesi di reato.

5. CASI DI MOZZARELLA BLU NEL TERRITORIO DELLA ASL FROSINONE NELL'ANNO 2012

A partire dal 2010, sono stati portati all'attenzione dell'opinione pubblica e con grande risalto mediatico, alcuni casi di alterazioni cromatiche di mozzarelle (le cosiddette "mozzarelle blu").

Tale fenomeno a rilevanza nazionale, ha avuto riflessi anche in ambito locale dove segnalazioni ed interventi si sono susseguiti nel tempo a testimonianza del fatto che, pur non afferendo alla sfera della salute pubblica, le problematiche collegate a colorazioni anomale di alimenti, e riportate con enfasi dai media, hanno assunto un forte impatto sulla percezione dei livelli di sicurezza alimentare da parte del consumatore, e determinato di conseguenza preoccupazione tra i cittadini.

In linea con quanto avvenuto sul resto del territorio nazionale e regionale nell'anno 2012, i Servizi Veterinari della ASL Frosinone hanno trattato n. 4 casi di colorazione anomale di prodotti a pasta filata, mentre un caso di alterazione cromatica è stato segnalato in un trancio di mortadella.

1° CASO - Gennaio 2012

Mozzarella con colorazione blu acquistata presso un punto vendita nella città di Frosinone e prodotta in uno stabilimento laziale.

Un consumatore ha segnalato l'acquisto di mozzarelle in confezione originale da banco che all'apertura si presentavano con macchie di colorazione blu. Le mozzarelle erano state acquistate lo stesso giorno ed erano nel periodo di conservabilità riportato in etichetta.



Nell'ambito dell'indagine sanitaria, il Servizio di Ispezione degli alimenti di origine animale, ha campionato il prodotto come reperto e ha effettuato una ispezione nell'esercizio di vendita, dove ha rinvenuto altre confezioni originali integre del prodotto del lotto interessato, ancora in vendita su cui ha eseguito un campionamento ufficiale (DPR 327/80).

Nel corso dell'ispezione sono state verificate le procedure di rintracciabilità applicate nel punto vendita, e le modalità di conservazione dell'alimento.

Le evidenze riscontrate e l'esame della documentazione relativa alla gestione della temperatura ha evidenziato la regolarità dei comportamenti dell'Azienda e l'assenza di criticità nella gestione del prodotto nel punto vendita.

L'esito analitico del campionamento eseguito ha dimostrato la presenza di *Pseudomonas fluorescens* e lieviti sia nel campione presentato dal consumatore,

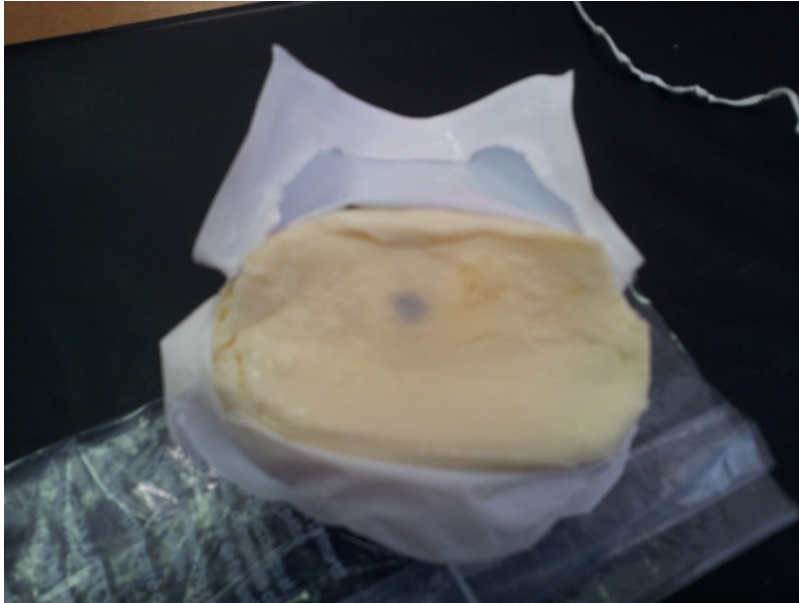
aperto e non integro, sia nel campione effettuato nel punto vendita sui prodotti sigillati.

Come conseguenza il riscontro di *Pseudomonas fluorescens* alle concentrazioni refertate ($>10^8$ ufc/gr) nel prodotto integro durante il periodo di validità, ha avuto come conseguenza la segnalazione all'Autorità Giudiziaria dell'Azienda produttrice ai sensi dell'Art. 5 lett b) della legge 283/62 per aver posto in commercio prodotti alimentari in cattivo stato di conservazione.

2° CASO - Gennaio 2012

Formaggio a pasta filata e di produzione tedesca.

Si è trattato di una confezione aperta di formaggio a pasta filata presentata direttamente da un consumatore con unica macchia blu nella superficie di taglio (diametro 0,5 cm). Il consumatore riferisce dell'acquisto, qualche giorno prima, presso un punto vendita di Frosinone



L'alterazione si è manifestata dopo l'apertura a distanza di circa 4 giorni dall'acquisto dopo conservazione domestica. L'alimento è stato oggetto di campionamento ufficiale reperto, (una sola aliquota con convocazione della parte per la presenza durante l'analisi, il cui esito non ha evidenziato proliferazioni anomale.

L'alterazione era dovuta a muffa superficiale e non è stata formulata alcuna ipotesi di reato.

3° CASO – Gennaio 2012

Colorazione blu su mozzarelle lavorate, utilizzate per la produzione domestica di “lasagne al forno”.

La mozzarella è stata acquistata presso un supermercato della provincia e prodotta in uno stabilimento marchigiano.

Dopo la preparazione l'alimento è stato mantenuto a temperatura ambiente per oltre 12 ore, e l'alterazione si è resa evidente prima della cottura.

Causa dell'alterazione erano quindi le non adeguate condizioni di conservazione.

Non è stata formulata nessuna ipotesi di reato e non è stato preso nessun provvedimento.



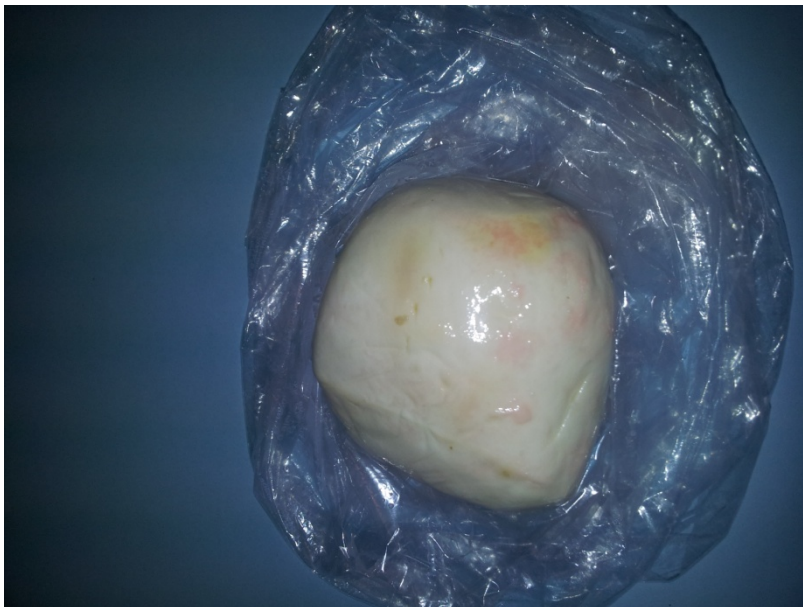
4° CASO – Novembre 2012

Colorazione rosa in mozzarella acquistata presso un supermercato di Frosinone.

La mozzarella è stata presentata direttamente da un consumatore all'interno di una busta anonima di polietilene per alimenti e presentava chiazze superficiali diffuse di colorazione rosa.

Si riferiva dell'acquisto presso un supermercato della città con confezione tipo "TRIS" di un noto marchio nazionale. Non è stato possibile risalire al lotto di produzione in quanto il reperto era privo di tutti gli elementi identificativi, confezione singola e imballo.

Il prodotto all'ispezione visiva presentava tutti gli aspetti tipici della proliferazione superficiale da *Pseudomonas* spp. o lieviti: colorazione diffusa sulla superficie esposta.



Non è stato eseguito il campionamento del prodotto.

Pur non avendo l'esponente fornito informazioni tali da poter ricondurre con certezza al prodotto interessato ed all'origine del problema segnalato sono stati effettuati:

- a) sopralluogo ed ispezione presso il punto vendita, nel corso del quale sono state verificate le modalità di esposizione e vendita, le modalità di gestione

delle temperature e la documentazione relativa: nel supermercato è risultato attivo un sistema di controllo delle temperature telegestito, che nel periodo in cui il prodotto segnalato è stato conservato ed esposto per la vendita non ha segnalato nessun allarme per temperature non conformi.

- b) Esame ispettivo ed organolettico su 03 confezioni di mozzarelle dello stesso marchio, confezione “TRIS”, scelte tra quelle esposte per la vendita, in corso di validità. Sia in superficie che al taglio non sono risultate alterazioni ed i prodotti si presentavano con le caratteristiche normali e tipiche del prodotto.



L'esame della documentazione commerciale ha mostrato che il lotto, probabilmente riconducibile all'esposto, era stato nel frattempo totalmente venduto.

Nel caso di specie, quindi l'istruttoria è stata conclusa senza ulteriori provvedimenti in quanto:

1. il prodotto è stato presentato privo di ogni elemento in grado di consentire la sua inequivoca identificazione;
2. non è stato possibile stabilire né il momento né la causa della alterazione (pre o post vendita);
3. l'alterazione riscontrata non è attribuibile all'azione di agenti patogeni per il consumatore;
4. i prodotti del medesimo tipo e produttore posti in vendita nel

supermercato erano regolamentari dal punto di vista igienico;

5. i controlli eseguiti nel punto vendita non hanno evidenziato irregolarità;

6. nessun altro reclamo o esposto o comunicazione di irregolarità per quella partita di prodotto è stata raccolta nel periodo a fronte di una fornitura di 480 pezzi.

6. Conclusioni.

Le segnalazioni da parte dei cittadini presso le sedi dei servizi veterinari circa l'alterazione cromatica di prodotti a pasta filata, in particolar modo mozzarelle, sono numerose. Sebbene alcuni esperti ipotizzano che alla base di queste alterazioni possano esserci modificazioni della flora microbica di alcuni tipi di formaggi freschi, ed il tipo di acidificazione applicata nel processo produttivo (maturazione acida e non presamica), si può affermare che il fenomeno, noto e antico, è invece direttamente proporzionale al livello e qualità dell'inquinamento microbico e all'allungamento della Shelf-life dei prodotti.

L'alterazione si manifesta con la presenza di piccole aree di colorazione bluastre-viola che hanno la tendenza ad estendersi a tutta la superficie alcune ore dopo l'apertura. Gli studi condotti convergono che la causa della colorazione è legata ad una contaminazione, più frequentemente in fase di produzione, del prodotto o del liquido di governo, da parte di un batterio del genere *Pseudomonas*.

Il microrganismo non è inserito tra gli indicatori di igiene o di sicurezza alimentare da parte della comunità scientifica, in quanto non pericoloso per l'uomo per via alimentare, seppure ben conosciuto dai produttori del settore lattiero caseario per le sue capacità di causare alterazioni nel latte e nei formaggi.

Oggi le tecnologie di produzione utilizzate dall'industria alimentare ed i metodi di conservazione impiegati consentono, rispetto al passato, un considerevole miglioramento delle caratteristiche igieniche ed un allungamento della *shelf-life* dei prodotti alimentari, esponendoli nel contempo ad un maggiore rischio di alterazione soprattutto verso la fine della loro vita commerciale.

I batteri coloranti sono molto diffusi ovunque, e la loro presenza nelle acque utilizzate nei processi produttivi, sia per pulire gli ambienti e le attrezzature, che più direttamente a contatto con gli alimenti, come nel caso delle acque usate per il raffreddamento e rassodamento, o ancor più per la produzione del liquido di governo (c.d. salsetta), è la causa principale del fenomeno. Naturalmente per manifestarsi deve anche esserci una fase di moltiplicazione e sviluppo con produzione di pigmento, che avviene in presenza di condizioni ambientali favorevoli, così come di umidità e di temperatura.

In condizioni di abuso termico durante la commercializzazione o in ambito domestico può determinarsi una sovracrescita esponenziale del microrganismo che rappresenta fino al 90% della flora microbica totale di un alimento.

Un elemento di controllo sicuramente efficace per il contenimento del fenomeno, anche se non alla sua risoluzione, è rappresentato dal trattamento termico del pre-confezionamento delle acque destinate alla preparazione del liquido di governo.

Ciò garantisce il controllo di una fonte della contaminazione, ma non delle altre, e pertanto assume fondamentale importanza la gestione post-produzione delle temperature nelle fasi di stoccaggio e distribuzione e vendita; perché, pur esistendo ceppi in grado di replicarsi anche a temperature di refrigerazione, si rallentano comunque i processi di replicazione microbica e di produzione di pigmento.

Prendendo in considerazione le esperienze relative alle segnalazioni dell'anno 2012 in provincia di Frosinone risulta evidente che 3 segnalazioni su 4 totali, sono riconducibili allo stesso periodo e soprattutto a seguito di notizie apparse sulla stampa.

Ciò depone a favore di un effetto “amplificazione” dovuto al rilievo mediatico dato ai casi di mozzarella blu, ricotta rossa, che si manifesta con un elevato livello di attenzione rispetto alle variazioni cromatiche degli alimenti piuttosto che ad una vera e propria stagionalità delle manifestazioni.

Inoltre gli accertamenti effettuati in seguito alle segnalazioni hanno dimostrato che, nella maggior parte dei casi, i problemi non erano imputabili al prodotto in commercio, ma alle sue modalità di gestione da parte del consumatore.

Infatti, a parte per il primo caso in cui è stata provata la responsabilità del produttore e formulata l'ipotesi di reato per la violazione dell'art. 5 lettera b) della Legge 30 aprile 1962 n. 283 negli altri casi la causa delle alterazioni rilevate è stata sempre ricondotta alle non adeguate condizioni di gestione degli alimenti in ambito domestico (consumo a distanza di giorni dopo l'apertura della confezione, conservazione a temperatura ambiente ecc).

In queste condizioni non è possibile stabilire l'origine della contaminazione da *Pseudomonas*, se previa vendita (al momento della produzione) o da contaminazione casalinga post apertura: il ruolo determinante nell'appalesarsi dell'alterazione è svolto dalla temperatura di conservazione che favorisce lo sviluppo e la proliferazione dei batteri cromogeni eventualmente presenti.

Questi ultimi, a loro volta, pur rendendo inadatto per il consumo il prodotto alimentare, non rivestono importanza ai fini della patogenicità in quanto non sono in grado di causare danni alla salute del consumatore. Non è possibile quindi nel caso di queste alterazioni cromatiche ipotizzare il reato di cui all'Art 444c.p. (prodotto nocivo). Le responsabilità penali legate al commercio di prodotti con colorazioni anomale sono considerate dall'Art 5 lett. b, d, della legge 283/62.

In conclusione si può affermare che nel caso dei fenomeni di alterazione cromatica dei formaggi freschi a pasta filata, "mozzarella blu", il cui risalto mediatico è inversamente proporzionale alla sua reale importanza sanitaria, una corretta informazione ed educazione dei consumatori sul trattamento degli alimenti post-acquisto, rappresenterebbe di per sé un concreto ed efficace fattore di controllo, attestato che il non adeguato trattamento domestico ne è causa determinante.

Infatti, i primi 3 casi descritti e accaduti nella nostra provincia, per quanto insufficienti da soli a farci trarre conclusioni generali, nonostante perfettamente coerenti con quanto rilevato negli episodi su scala nazionale, dimostrano che la non corretta gestione domestica dell'alimento è alla base del manifestarsi dell'alterazione. Colpisce inoltre il fatto che gli episodi sono tutti concentrati in un periodo in cui la pressione e attenzione dei media sull'argomento è stata continua.

Solo l'ultimo caso, infine, riporta l'attenzione sul fatto che la contaminazione può originarsi direttamente nella fase di produzione, dove sono soprattutto l'igiene ambientale e quella delle acque utilizzate, a ricoprire un ruolo determinante sulla qualità ed entità delle rappresentanza microbica alterante. Di fondamentale importanza quindi l'igiene della produzione e nel rispetto delle temperature in fase di conservazione, trasporto e vendita, ai fini dell'ottenimento di alimenti ineccepibili dal punto di vista igienico-sanitario e soprattutto sicuri per i consumatori finali, quali siamo tutti noi.

BIBLIOGRAFIA

Carlo Cantoni, Johannes Kramer. - 1994 - Alimenti microbiologia ed Igiene OEMF “

Giordano De Felip - 2001- Recenti sviluppi di Microbiologia ed Igiene degli alimenti Tecniche nuove.

Gianpaolo Colavita -2008– Igiene e tecnologie degli alimenti di origine animale – Le Point Veterinarie

Tiecco G. (2001) - Igiene e tecnologie degli alimenti. Bologna, Edagricole.

Galli Volonterio A. (2005) - Microbiologia degli alimenti. Casa Editrice Ambrosiana, Milano.

AlaisCh. - Scienza del Latte. Ed. Tecniche nuove, Milano

Corradini C., 1995. Chimica e tecnologia del latte, Ed. Tecniche Nuove, Milano

Germano Mucchetti, Erasmo Neviani - Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia. Qualità e sicurezza Tecniche nuove

Conte F., Rapisarda, Belvedere, Beninati C., Carpino S., Licitra G- STABILITA' DI UN FORMAGGIO FRESCO A PASTA FILATA. VALUTAZIONI ANALITICHE TRADIZIONALI E CON UNO SMART NOSE SYSTEM- A.I.V.I Giugno 2011, vol. 1 n. 0

Costato, Borghi, Rizzioli - 2011– Compendio di Diritto alimentare Quinta Edizione CEDAM

Bevilacqua A., Ficelo S., Corbo M.R., Sinigaglia M. (2008) “Significato tecnologico delle *Pseudomonadaceae* nella mozzarella. Effetto di antimicrobici naturali e valutazione del metabolismo con metodiche alternative”. Industrie alimentari, 47: 855-860.

Bilei S., Bogdanova T., FloresRodas E. M., Greco S., De Angelis V., Di Domenico I., Palmieri P., Zottola T. (2010) “*Pseudomonas* spp. in fiordilatte al dettaglio” XII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., Volume Atti, 117:118.

Bogdanova T., FloresRodas E. M., Greco S., Tolli R., Bilei S. (2010) “Indagine microbiologica su campioni di mozzarella in occasione dell’allerta *Mozzarella blu*”, XII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., Volume Atti, 148:149.

Cabrini A., Neviani E. (1983) “il genere *Pseudomonas* come causa di sapore amaro e di odore putrido sulla superficie di formaggio Mozzarella”. Il latte, 8: 90-93.

Cantoni C., Marchisio E., Galli M. (2000) “Causa della colorazione blu-verde delle mozzarelle” *Industrie Alimentari*, 39: 586-588.

Cantoni C., Milesi S., Iacumin L. (2006) “*KocuriarhizophilaPseudoclavibacterhelvoluse Pseudomonasputida* quali germi alteranti i prodotti lattiero-caseari”. *Industrie alimentari*, Dicembre, 1261-1263.

Cantoni C., Soncini G., Milesi S., Cocolin L., Iacumin L., Comi G., (2006) “Colorazioni anomale e rigonfiamento di formaggi fusi e mozzarelle”. *Industrie alimentari*, 45: 276-281.

Cantoni C., Stella S., Cozzi M., Iacumin L., Comi G. (2003) *Industrie Alimentari*, 42: 840-843.

Cantoni C., Stella S., Ripamonti B., Marchese R. (2001) *Industrie Alimentari*, 40: 33-35.

Cantoni – Chiappa - Batteri produttori di pigmenti blu e chiazze di alimenti - Giugno 2011

Ercolini D., Russo F., Blaiotta G., Pepe O., Mauriello G., Villani F. (2007) Simultaneous “Detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, and *P. putida* from Meat by Use of a Multiplex PCR Assay Targeting the *carA* Gene”. *Applied and environmental microbiology*, 73 (7): 2354–2359.

Signorini, Biagi, Nannipieri, Pandolfi- LA NORMATIVA COMUNITARIA VIGENTE NEL SETTORE ALIMENTARE *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma* (Vol. XXV, 2005) - pag. 293 - pag. 306

Paonessa. 2004 Influenza del liquido di governo su alcuni aspetti della conservazione della Mozzarella di bufala campana DOC.

Anzai, Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H., Oyaizu H. (2000) “Phylogenetic affiliation of the Pseudomonads based on 16S rRNA sequence”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1563–1589.

Ayres J. C. (1960) “The relationship of organisms of the genus *Pseudomonas* to the spoilage of meat poultry and eggs”. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 471-486.

Cousin M. A. (1982) “Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review”. *Journal of Food Protection*, 45:172–207.

Dabboussi F., Hamze M., Elomari M., Verhille S., Baida N., Izard D., Leclerc H. (1999) “*Pseudomonas libanensis* sp. nov., a new species isolated from Lebanese spring waters”. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 1091-1101.

De Jonghe V., Coorevits A., Van Hoorde K., Messens W., Van Landschoot A., De Vos P., Heyndrickx M. (2011) “Influence of Storage Conditions on the

Growth of *Pseudomonas* Species in Refrigerated Raw Milk". *Applied Environmental Microbiology*, January, 77 (2): 460-470.

Dogan B., Boor K.J. (2003) "Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* from fluid milk products and dairy processing plants". *Applied Environmental Microbiology*, 69: 130-138.

Doyle M.P., Beuchaz L.R., Mornville T.J. (2001) *Food microbiology. Fundamentals and Frontiers*, second edition. ASM Press, Washington D.C.

Drosinos E. H., Board R. G. (1995) "Microbial and physicochemical attributes of minced lamb: sources of contamination with pseudomonads". *Food Microbiology*, 12: 189-197.