

SICUREZZA DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE

# Vecchi pericoli e nuovi rischi microbiologici



MARILENA FORTUNATO, ORIANA DE LUCA, GIAMPAOLO COLAVITA

Dipartimento di Medicina e Scienze della Salute "V. Tiberio", Università degli Studi del Molise, Campobasso

I pericoli che possono interessare gli alimenti e i fattori di rischio che li favoriscono sono molteplici. Tutte le materie prime, sia di origine vegetale sia animale, possono veicolare microrganismi patogeni, tossine, residui di prodotti fitosanitari, farmaci, additivi, contaminanti ambientali ecc..

Per gli alimenti di origine vegetale, sovente il consumatore ha la percezione di un minor livello di rischio rispetto agli alimenti di origine animale, soprattutto per quanto riguarda i pericoli di natura biologica [2]. Sostanzialmente anche il legislatore comunitario ha ritenuto porre maggiore attenzione agli alimenti di origine animale, considerati più a rischio, prevedendo per essi tutta una serie di norme specifiche per l'autocontrollo e il controllo nelle diverse filiere. Evidentemente però, nel concetto di "one safety" viene meno la separazione tra controllo degli alimenti di origine animale e alimenti di origine vegetale, definendosi un approccio di sicurezza ali-

mentare globale, sempre più in stretta relazione anche con l'ambiente.

## Aspetti epidemiologici

Diversi sono gli episodi di malattie alimentari connessi al consumo di alimenti di origine vegetale che si sono registrati nel corso degli anni e in particolare nell'ultimo decennio. In linea con i dati epidemiologici più generali sulle malattie alimentari, gran parte delle segnalazioni fanno riferimento agli Stati Uniti e all'Unione Europea (tabella 1).

Secondo quanto riferito nel Report annuale ECDC-EFSA sulle zoonosi e malattie trasmesse da alimenti, nel 2010 nell'Unione Europea (UE) si è registrato un aumento dei focolai di malattia causati da alimenti di origine vegetale, passando dai 21 del 2009 ai 61 del 2010. Le segnalazioni riferite

**Tabella 1. Microrganismi patogeni responsabili di focolai di malattia alimentare da consumo di vegetali.**

Anno	Microrganismo	Alimento	Paese	Riferimento bibliografico
2000-2002	<i>Salmonella</i> Poona	Melone	Messico, Stati Uniti e Canada	[11]
2004	<i>Salmonella</i> Thompson	Rucola	Norvegia	[35]
2005	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Lattuga	Svezia	[40]
2006	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Pomodori	Stati Uniti (Mississippi)	[12]
2006	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Spinaci freschi	Stati Uniti	[13]
2008	<i>Salmonella</i> Litchfield	Meloni cantalupo	Stati Uniti	[14]
2010	<i>Escherichia coli</i> O145	Lattuga romana	Stati Uniti	[15]
2010	<i>Listeria monocytogenes</i>	Sedano	Stati Uniti (Texas)	[25]
2010	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Barbabietola	Francia	[23]
2011	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Fragole	Stati Uniti (Oregon)	[31]
2011	<i>Escherichia coli</i> O104:H4	Germogli	Germania	[19]
2011	<i>Clostridium botulinum</i>	Pasta di olive	Francia	[38]
2011	<i>Shigella sonnei</i>	Basilico	Norvegia	[27]
2012	<i>Salmonella</i> Typhimurium <i>Salmonella</i> Newport	Melone	Stati Uniti	[16]
2014	<i>Salmonella</i> Newport	Cetrioli	Stati Uniti	[1]

a contaminazioni batteriche (principalmente da *Salmonella* spp.) dei prodotti di origine vegetale hanno riguardato soprattutto la rucola e le insalate miste da foglia e da taglio [2]. Già nel 2005, in Svezia, erano stati registrati 135 casi di infezione da *Escherichia coli* verocitotossici (VTEC), di cui 11 di Sindrome Emolitica Uremica (SEU), a seguito del consumo di lattuga che era stata irrigata con acqua proveniente da un piccolo torrente, dalle cui acque è stato isolato un ceppo di *E. coli* O157:H7 produttore di Shiga-tossina 2 (STx2). Lo stesso ceppo è stato poi isolato dal bestiame di una fattoria sita a monte del punto di irrigazione e dalle persone malate [41]. Nel 2006, in diversi stati degli USA si sono registrati 183 casi di salmonellosi da *Salmonella* Typhimurium per consumo di pomodori [45].

Nel maggio 2011, la Germania ha lanciato un'allerta comunitaria dopo il manifestarsi di diversi casi di SEU e diarrea emorragica da *E. coli* STEC, che le indagini microbiologiche tradizionali e di biologia molecolare hanno ricondotto al sierotipo O104: H4. Nel giro di poco tempo anche le autorità francesi hanno segnalato un focolaio da *E. coli* O104:H4 nella regione di Bordeaux. Il numero complessivo dei casi segnalati nella UE, incluse Norvegia e Svizzera, è stato di 4.178, con 48 morti in Germania e 1 in Svezia. Inizialmente sembrava che il batterio fosse stato veicolato da alcune partite di cetrioli spagnoli, ma le analisi e le successive ricerche hanno smentito tale ipotesi, attribuendo l'origine a un lotto di semi di fieno greco, importato dall'Egitto e utilizzato per produrre germogli [19].

Nel 2011, negli USA, si sono registrati casi di salmonellosi da *S. Enteritidis* in seguito al consumo di pinoli provenienti dalla Turchia, spesso utilizzati come ingredienti nelle insalate, e ancora 127 casi da *S. Braenderup* si sono verificati, nel 2012, per consumo di mango proveniente dal Messico [46].

Tra giugno e settembre del 2012, in ben 24 Stati si sono registrati 261 casi di salmonellosi da *S. Typhimurium* e *S. Newport* connessi al consumo di meloni provenienti da un'azienda dell'Indiana. Dalla superficie dei meloni i ricercatori della FDA hanno isolato un ceppo di *S. Typhimurium* e un ceppo di *S. Newport* identici a quelli responsabili del focolaio. L'anno prima, invece, si erano verificati casi di salmonellosi da *S. Panama* per consumo di meloni cantalupo [12]. Nello stesso anno, 147 persone sono state colpite da listeriosi e 33 sono decedute dopo aver consumato sempre meloni cantalupo provenienti da un'azienda del Colorado [17].

Nel 2013 *S. Saintpaul* è stata responsabile di 84 casi di salmonellosi per consumo di cocomeri provenienti dal Messico [18]. Nel corso del 2013 in Svezia e nel Regno Unito si sono avute tre epidemie da *E. coli* VTEC associate al consumo di insalate pronte [10]. Sempre nel 2013, in Germania, è stata segnalata un'epidemia associata al consumo di insalata mista [21].

I dati dell'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) confermano *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. ed *E. coli* STEC (O104:H4, O157:H7, O121, O26, O154) quali principali agenti di infezioni alimentari associate ai prodotti vegetali di IV gamma (insalate miste e germogli).

Una serie di focolai di malattia sono stati registrati nel 2014 in diverse scuole della Francia, ma già nel 2010, in alcune scuole del Morbihan, circa 500 bambini avevano accusato mal di stomaco e vomito appena 15-30 minuti dopo il pasto. Studi retrospettivi di coorte, effettuati dall'Agenzia nazionale per la sicurezza sanitaria dell'alimentazione, dell'ambiente e del lavoro, hanno evidenziato una significativa correlazione tra l'insorgenza improvvisa dei sintomi e il consumo di barbabietola grattugiata. Episodi simili si erano verificati in Finlandia nel 2010 e avevano interessato 124 persone [28]. Le analisi microbiologiche effettuate sulla matrice sospetta non hanno evidenziato agenti patogeni di origine alimentare quali: *Staphylococcus aureus* ed enterotossine, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* e neppure micotossine e residui di pesticidi. Le barbabietole provenivano dal Belgio e dalla Spagna ed erano state lavorate presso un'azienda di trasformazione francese, dove erano state pelate, lavate e grattugiate. Successivamente sono state confezionate in sacchetti di plastica, con una *shelf life* di 6 giorni a temperatura di + 4 °C, condizioni queste che possono favorire lo sviluppo di microrganismi psicrotrofi del genere *Pseudomonas*. Per tale motivo, sulla scorta di quanto era stato fatto in Finlandia, le indagini sono state estese anche alla ricerca di questi microrganismi, portando all'isolamento di *Pseudomonas fluorescens*, a cariche > 2.11 cfu/g nelle barbabietole intere e in quelle grattugiate. Evidentemente le indagini analitiche non sono state esaustive e non si è potuto accertare con sicurezza la responsabilità del microrganismo, ma in ogni caso l'EFSA ha ritenuto che si trattasse di un pericolo emergente da indagare meglio [23].

Sempre nel 2014, negli Stati Uniti sono stati segnalati 115 casi di salmonellosi da *S. Enteritidis*, per consumo di germogli di fagiolo. Analoghi episodi erano stati registrati già nel 2010 [42]. Nel 2016 si sono verificati casi di salmonellosi da *S. Montevideo* e *S. Senftenberg* in seguito al consumo di pistacchio [43]. Sempre negli USA e nello stesso anno, *S. Reading* e *S. Abony* hanno provocato 60 casi di salmonellosi per consumo di germogli di erba medica [44].

Tra il 2007 e il 2011, nell'Unione europea si sono registrati anche 27 focolai di infezione da *Norovirus* associati al consumo di lamponi (in 19 focolai si trattava di lamponi surgelati).

Un altro focolaio da *Norovirus* (9 casi) connesso al consumo di frutti di bosco è stato segnalato nel 2011 in Finlandia, mentre 103 casi di epatite A si sono verificati nel 2012-13 in Danimarca, Finlandia, Norvegia e Svezia associati al consumo di fragole congelate. Una vasta epidemia con 10.952 casi di infezione da *Norovirus* ha interessato la Germania nel 2012 e anche in questo caso si è trattato di fragole congelate [3]. Non è noto se in questi focolai la contaminazione dei frutti di bosco si sia verificata in produzione primaria o *post* primaria [22].

## Meccanismi di contaminazione e internalizzazione microbica nei vegetali

L'origine della contaminazione microbica degli alimenti vegetali è spesso di difficile individuazione. Per quelli freschi interi essa è riconducibile principalmente all'acqua di irrigazione e al terreno (concimazione, deiezioni umane e animali). Il letame, se non è correttamente gestito e controllato, può portare alla diffusione di microrganismi patogeni e all'inquinamento delle falde acquifere. Per i vegetali sottoposti a lavorazione, la contaminazione è associata, invece, al personale addetto alla manipolazione nelle varie fasi della filiera e alla non corretta igiene delle attrezzature e delle superfici destinate a venire in contatto con gli alimenti [5].

I principali microrganismi patogeni associati al consumo di prodotti vegetali appartengono alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (*E. coli* STEC, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*). Batteri come *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* fanno parte della microflora del terreno, mentre *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* e *Campylobacter* risiedono nell'intestino degli esseri umani e animali e possono contaminare frutta e verdura che vengono a contatto con feci, liquami o acque inquinate. Inoltre, anche *L. monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, agenti virali (*Norovirus* e Virus dell'epatite A, *Rotavirus* ed *Astrovirus*) e parassiti possono inquinare i vegetali [2].

Mentre in passato si riteneva che la presenza di batteri patogeni nei prodotti vegetali fosse solo conseguenza di una contaminazione superficiale e occasionale in fase di *pre* o *post* raccolta o al momento del consumo, per scarsa igiene di processo, nell'ultimo decennio è stato evidenziato che diversi microrganismi possono penetrare nei tessuti vegetali e vi possono moltiplicare.

### *Escherichia coli* O157

Sebbene gli alimenti più a rischio per *E. coli* O157 siano i prodotti di carne bovina, anche la frutta e gli ortaggi consumati crudi possono essere un importante veicolo d'infezione, se contaminati mediante il letame contenente il microrganismo [39]. Negli Stati Uniti uno stesso ceppo di *E. coli* O157, responsabile di un focolaio di malattia alimentare da consumo di spinaci confezionati, è stato isolato da deiezioni suine e bovine usate per la concimazione. Si è visto che il microrganismo può aderire tenacemente alla superficie dei pomodori, alle foglie di spinaci e alle radici dei germogli di soia. L'adesione è favorita dai curl (noti come fattori di adesione alla mucosa intestinale) e da un sistema filamentoso di secrezione (T3SS) o dai flagelli (29). Similmente alle salmonelle, i ceppi di *E. coli* O157 possono raggiungere la regione sub-stomale dei vegetali, riuscendo a sopravvivervi.

Nella lattuga è stata dimostrata l'internalizzazione di un ceppo di *E. coli* O157 contenente GFP (*Green Fluorescent*

*Protein*) proveniente dal terreno e dall'acqua di irrigazione contaminati mediante il letame. Il microorganismo può diffondere alle parti edibili della lattuga attraverso l'apparato radicale, anche se il meccanismo non è ancora ben conosciuto. Per capire se il microorganismo può arrivare dall'apparato radicale alla parte edibile, a partire da letame utilizzato per la fertilizzazione o da acqua contaminata usata per l'irrigazione, è stato effettuato un *challenge test*. Sezioni di piantine di lattuga sono state esaminate mediante microscopia a fluorescenza 3, 6, 9 giorni dopo la raccolta e cellule di *E. coli* O157:H7/GFP sono state rilevate sui cotiledoni. In alcuni campioni, inoltre, il patogeno è stato individuato, in quantità elevata, 45 micron al di sotto della superficie, il che ha fatto pensare a una sua migrazione verso la parte interna. Inoltre, il batterio può penetrare nelle radici della lattuga matura e può essere trasportato verso la parte epigea della pianta, all'interno delle parti edibili. Anche se la carica di *E. coli* O157:H7, utilizzata nello studio, era di gran lunga superiore a quella che si può trovare in condizioni naturali, si ritiene che anche un basso livello di contaminazione potrebbe rappresentare un significativo rischio per la salute umana, dal momento che la dose infettante per l'uomo è inferiore a 1.000 ufc/g. I risultati di questo studio, inoltre, portano a ritenere che la sanificazione della lattuga non sia un metodo efficace per eliminare *E. coli* O157:H7, in quanto il microorganismo può portarsi anche in profondità, così da essere al riparo dal trattamento igienizzante [41].

#### ***Salmonella* spp.**

*S. enterica* è la specie che più frequentemente provoca casi di tossinfezione legati al consumo di frutta e vegetali. I sierotipi più diffusi sono *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, che possono colonizzare i semi germogliati, la frutta e diversi tipi di ortaggi.

Uno studio ha dimostrato che *Salmonella* spp., inocolata in piante di pomodoro in fase di fioritura, può ritrovarsi nei frutti in maturazione [26]. È stato ipotizzato che il germe possa essere internalizzato nei pomodori anche attraverso soluzioni di continuo dello stelo provocate da fitopatogeni. Il microorganismo entrerebbe nello xilema che trasporta acqua e nutrienti dalla radice fino alle estremità della pianta. Con la maturazione la quantità di saccarosio presente nel pomodoro diminuisce, mentre l'amido e gli zuccheri riducenti aumentano favorendo la moltiplicazione del microorganismo.

L'assorbimento di *Salmonella* spp. per via radicale è stato studiato nei meloni, che negli ultimi anni hanno suscitato le preoccupazioni della *Food and Drug Administration* (FDA). Anche se i dati sono ancora scarsi, vi sono evidenze che associano la qualità dell'acqua di irrigazione al rischio di contaminazione dei meloni in campo [34]. I primi studi hanno suggerito che *Salmonella* spp. ed *E. coli* STEC potrebbero essere trasportati alle parti edibili delle piante attraverso la ra-

dice [41]. Tuttavia, studi recenti hanno dimostrato che l'internalizzazione di questi patogeni è un evento possibile qualora essi siano presenti in cariche elevate [24]. I meloni sono stati irrigati con acqua contaminata volontariamente e contenente una elevata carica di *S. Typhimurium* aPTVS150 e sia nel caso di irrigazione a goccia sia a solco, il microorganismo è stato ritrovato sulla superficie dei meloni, ma non nelle parti edibili. Invece, inoculando ripetutamente elevate cariche attraverso una lesione del peduncolo, *Salmonella* spp. è stata ritrovata nello stelo e questo porterebbe a pensare che il microorganismo possa raggiungere lo xilema tramite una ferita e arrivare così alle parti interne, anche se fortemente condizionato dalla carica. Comunque i risultati di questo studio indicano che, in condizioni di campo, qualora i meloni siano irrigati con acqua contaminata, è molto improbabile che *Salmonella* spp. sia assorbita dalle radici e trasportata per via sistemica.

#### ***Listeria monocytogenes***

Numerosi studi hanno dimostrato che *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* in particolare, possono ritrovarsi nel terreno, nel fango, nelle acque superficiali e nei vegetali. La presenza di *Listeria monocytogenes* è stata rilevata nei cavoli, nel radicchio, nelle patate e nelle insalate pronte per il consumo, nonché nei pomodori, nei cetrioli e in diversi frutti. Uno studio ha cercato di valutare la possibilità di internalizzazione di *L. monocytogenes* dalla superficie alle parti commestibili dell'avocado durante le operazioni *post* raccolta. Si è potuto accertare che nell'arco di 15 giorni, a + 4 °C, il microorganismo può raggiungere la polpa del frutto sia se viene inoculato a livello dello stelo, sia se il frutto viene immerso in acqua contaminata volontariamente [8]. Infatti, elevate cariche di *L. monocytogenes* sono state riscontrate nel gambo rispetto all'estremità inferiore del frutto, indicando che l'internalizzazione del patogeno è avvenuta attraverso la cicatrice dello stelo fino a diffondersi in altre aree del frutto. Normalmente i frutti che giungono presso gli impianti di imballaggio vengono sottoposti a lavaggio e, molto spesso, ancora bagnati, vengono confezionati e trasferiti nelle camere di raffreddamento; questa procedura determina un aumento dell'acqua libera sulla superficie dei frutti e faciliterebbe la sopravvivenza e la diffusione di *L. monocytogenes*. Si pensa che l'assorbimento di acqua da parte del frutto e l'internalizzazione del microorganismo avvengano tramite gli steli o le cicatrici. Lo studio ha suggerito che l'afflusso di acqua durante il raffreddamento, eventualmente favorito dal differenziale di temperatura, è tale da causare l'infiltrazione del patogeno dall'estremità dello stelo all'estremità inferiore dell'avocado.

#### ***Campylobacter* spp.**

Tra le specie segnalate come responsabili di infezioni gastrointestinali nell'uomo, riveste un ruolo primario *Campylobacter*

*jejuni*. In passato si è posta l'attenzione circa la capacità di questo microrganismo di sopravvivere sull'anguria e sulla papaya e l'effetto decontaminante che può avere il succo di limone. Cubetti di frutta sono stati inoculati con sospensioni del microrganismo e, in alcuni casi, è stato aggiunto succo di limone. Il microrganismo è sopravvissuto sulla frutta inoculata e conservata a temperatura ambiente per un massimo di 6 ore. La percentuale di sopravvivenza del microrganismo variava da 7,7 a 61,8% nella frutta senza aggiunta di succo di limone e da 0 a 14,3% in quella con aggiunta di succo di limone. I risultati hanno dimostrato che l'applicazione di succo di limone può ridurre significativamente la presenza di *C. jejuni*, in particolare nella papaya rispetto all'anguria, ma anche che *C. jejuni* può sopravvivere sull'anguria e sulla papaya affettati, per un tempo abbastanza lungo da poter rappresentare un rischio per il consumatore. Inoltre, l'aggiunta di succo di limone alla frutta tagliata sembra non essere completamente efficace ad eliminare il rischio di infezione [9].



Nella fase della produzione primaria, è importante evitare l'accesso degli animali domestici e selvatici ai campi e all'acqua di irrigazione; è possibile utilizzare spaventapasseri od oggetti riflettenti.

### Criteria microbiologici per i prodotti vegetali

Poiché sono considerati a basso rischio, per i prodotti ortofrutticoli freschi interi (prodotti di I<sup>a</sup> gamma) il Reg. CE 1441/07 non prevede criteri microbiologici di sicurezza alimentare, mentre sono stati stabiliti per i vegetali di IV gamma. Trattandosi di prodotti manipolati e pronti al consumo, il legislatore ha previsto *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* quali criteri di sicurezza alimentare (tabelle 2 e 3) e a seguito dell'epidemia da *E. coli* O104:H4 del 2011, ha ritenuto stabilire *E. coli* STEC come criterio di sicurezza per i semi germogliati (Reg. UE 209/13) (tabella 4), mentre come criterio di igiene di processo è stato definito *Escherichia coli* (tabella 5).

Gli ortaggi pretagliati e i succhi di ortaggi sono prodotti pronti al consumo con elevati valori di  $A_w$  e, in molti casi, scarsamente acidi (es., nel melone il pH è compreso tra 6 e 7, nell'anguria 5,2 e 5,5), per cui sono terreno favorevole allo sviluppo di *L. monocytogenes* e il valore è l'assenza del microrganismo in 25 g, così pure nei semi germogliati. Nel caso di ortaggi e succhi di ortaggi con pH <4,5 (es., crauti pH 3,4 – 3,6) e così pure per gran parte della frutta e succhi di frutta (es., mele pH 3,6 – 4,0), non essendo terreno favorevole per

lo sviluppo di *L. monocytogenes*, il valore tollerato è la presenza fino a 100 ufc/g in 25 g. Nel caso della frutta secca, dattosi che in molti casi la parte edibile è protetta dal guscio e  $A_w$  è < 0,92, è ragionevole ritenere che si tratti di alimenti a basso rischio per *L. monocytogenes*. In qualche modo il problema potrebbe porsi per la frutta secca sgusciata (es. mandorle e noci), ma anche in questo caso i bassi valori di  $A_w$  la rendono scarsamente a rischio [4].

In tutti i casi gli operatori del settore della produzione primaria sono tenuti a prevedere nei loro piani di autocontrollo le misure di controllo igienico-sanitarie in ogni fase della produzione, individuando gli elementi di pericolo per il consumatore [10].

### Controllo dell'igiene e della sicurezza dei prodotti di origine vegetale

Per la produzione primaria sono disponibili delle linee guida per le Buone Pratiche Agricole (GAP, 1998) che possono aiutare i produttori a controllare i pericoli microbiologici nella frutta e nella verdura. In questa fase è importante evitare l'accesso degli animali, domestici e selvatici, ai campi coltivati e alle fonti d'acqua utilizzate per l'irrigazione [7]. I produttori, inoltre, possono utilizzare spaventapasseri, strisce riflettenti, o spari per allontanare gli uccelli, roditori ed altri animali.

Come è ben noto, i vegetali freschi interi sovente possono essere contaminati mediante il letame che può veicolare microrganismi patogeni come batteri, virus e parassiti, soprattutto quando il compostaggio non è stato effettuato correttamente

**Tabella 2. Criterio di sicurezza alimentare: *Salmonella* spp. (Reg. CE 1441/07).**

Categoria alimentare	Microorganismo	Piano di Campionamento		Limiti	
		N	c	m	M
Semi germogliati (pronti al consumo)	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g o ml	
Frutta e ortaggi pretagliati (pronti al consumo)	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g	
Succhi di frutta e di ortaggi non pastorizzati (pronti al consumo)	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g	

**Tabella.3 Criterio di sicurezza alimentare: *Listeria monocytogenes*.**

Categoria alimentare	Microorganismo	Piano di Campionamento		Limiti	
		n	c	m	M
Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L. monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e ai fini medici speciali	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	Assente in 25 g	
Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole		5	0	100 ufc/g	

**Tabella 4. Criterio di sicurezza alimentare: *Escherichia coli* STEC: O157, O26, O111, O103, O145, O104:H4.**

Categoria alimentare	Microorganismi/ loro tossine, metaboliti	Piano di Campionamento		Limiti	
		n	c	m	M
Semi germogliati	<i>E. coli</i> STEC: O157, O26, O111, O103, O145, O104:H4	5	0	Assente in 25 g	

**Tabella 5. Criterio di igiene di processo: *Escherichia coli*.**

Categoria alimentare	Microorganismo	Piano di Campionamento		Limiti	
		n	c	m	M
Frutta e ortaggi pretagliati	<i>E. coli</i>	5	2	100 ufc/g	1000 ufc/g
Succhi di frutta e di ortaggi non pastorizzati	<i>E. coli</i>	5	2	100 ufc/g	1000 ufc/g

(tempo e temperatura inadeguati) [24]. Poiché il letame è il principale fertilizzante utilizzato nelle produzioni biologiche, si ritiene che il rischio di contaminazione dei vegetali da microrganismi fecali (*E. coli* STEC, *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas* spp., *Shigella* spp.) possa essere maggiore rispetto alle produzioni convenzionali, ma i pochi dati riportati in letteratura risultano contrastanti, per cui la tematica richiede ulteriori approfondimenti [32]. Per quanto riguarda l'acqua, è importante selezionare le fonti di irrigazione e sottoporle periodicamente ad analisi per verificare la presenza o meno di pericoli microbiologici e contaminanti chimici [30]. Sono state proposte diverse strategie per ridurre il rischio di contaminazione, ad esempio, il trattamento dell'acqua mediante: coagulazione, flocculazione, filtrazione e disinfezione; anche l'irraggiamento solare può contribuire

alla riduzione dei microrganismi patogeni, così pure l'uso di trattamenti disinfettanti [6].

In produzione *post* primaria, poiché nella lavorazione dei prodotti di IV gamma non ci sono fasi che possano "metterci al sicuro" da eventuali pericoli, bisogna applicare al meglio le Buone Prassi Igieniche (GHP), le Buone Pratiche di Fabbricazione (GMP) e i principi dell'HACCP. La refrigerazione è indispensabile per limitare o impedire lo sviluppo dei patogeni [33]. In particolare le verdure a foglia devono essere raffreddate rapidamente appena possibile (meno di 90 minuti) dopo la raccolta. Durante la fase di stoccaggio la temperatura delle celle deve essere mantenuta tra +4 °C e +6 °C. Il lavaggio consente di eliminare terriccio, corpi estranei e residui di sostanze indesiderate e di ridurre la carica microbica, per cui molte aziende utilizzano prodotti a base di cloro, general-

mente in concentrazioni tra 50 e 200 ppm e per un tempo di contatto di 1-3 minuti. Concentrazioni troppo basse hanno scarso effetto sui microrganismi, mentre concentrazioni troppo elevate possono lasciare residui nel prodotto. Oltre al cloro hanno efficacia le radiazioni UVC, l'ozono, l'acqua ossigenata e l'acido peracetico [36].

Nel corso di uno studio sono stati testati l'acido peracetico, il bicarbonato di sodio, l'ipoclorito di sodio e l'aceto per ridurre la carica di *S. enterica* e *L. monocytogenes* in campioni di rucola contaminata volontariamente. I risultati hanno dimostrato che il lavaggio con ipoclorito di sodio (200 mg/L) per 15 minuti era l'unico metodo in grado di portare a una riduzione significativa (2 Log) di *S. enterica*, ma solo nel caso in cui la contaminazione iniziale era elevata (7 Log ufc/g), mentre gli altri sanificanti hanno portato a una riduzione non significativa della carica di *S. enterica*. Nel caso di *L. monocytogenes*, invece, tutti i presidi sanificanti saggiati sono risultati efficaci, in particolare il lavaggio con ipoclorito di sodio (200 mg/L) per 15 minuti e quello con acido peracetico per 3 minuti, seguiti da un risciacquo con acqua di rubinetto per altri 3 minuti, che hanno portato alla riduzione più significativa, di 2 e 1,5 Log, rispettivamente [37].

Nella fase di stoccaggio e distribuzione è necessario il mantenimento della catena del freddo per evitare il deterioramento del prodotto e il rischio di proliferazione microbica. Le celle e i furgoni frigo devono assicurare il mantenimento della temperatura, che non deve superare +8 °C.

### Considerazioni conclusive

Come evidenziano i dati epidemiologici, attualmente le problematiche di sicurezza alimentare relative agli alimenti di origine vegetale, rispetto al passato, stanno assumendo sempre maggiore rilevanza, per cui è necessario approfondire la conoscenza dei possibili pericoli e implementare adeguate misure di gestione del rischio.

Ai fini del controllo della sicurezza dei prodotti di origine vegetale, il Regolamento 1441/2007 e s.m. prevede criteri microbiologici come *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ed *E. coli* produttori di Shiga tossina, ma solo per le produzioni ortofrutticole di IV gamma, per cui allo stato attuale manca un sistema di controllo in relazione alle caratteristiche produttive e ai flussi di filiera. La globalizzazione dei mercati e nuove abitudini alimentari portano a un rapido cambiamento dei contesti epidemiologici, per cui si rende necessario l'adozione sistematica di strumenti di gestione della sicurezza alimentare ben consolidati in alcune aree del mondo, ma ancora piuttosto precari in altre.

Gli strumenti da mettere a sistema sono le GMP, GHP e SSOP in produzione primaria, nonché in fase *post* raccolta e di lavorazione; anche gli operatori della produzione primaria dovrebbero essere incoraggiati ad applicare i principi del sistema HACCP per quanto possibile.

Occorre, inoltre, aumentare il grado di conoscenza relativa ai meccanismi di trasferimento, di sopravvivenza e di crescita dei microrganismi patogeni nei prodotti di origine vegetale, al fine di una corretta valutazione del rischio e un sistema di controllo efficace.

### Bibliografia

1. Angelo KM, Chu A, Anand M, Nguyen TA, Bottichio L, Wise M, Williams I, Seelman S, Bell R, Fatica M, Lance S, Baldwin D, Shannon K, Lee H, Trees E, Strain E, Gieraltowski L, 2015. *Salmonella* Newport infections linked to cucumbers—United States. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2014; 64 (6):144-147.
2. Berger CN, Sodha SV, Shawn RK, Griffin PM, Pink D, Hand PG. Frankel-Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology.* 2010; 12 (9): 2385-2397.
3. Bernard H, Faber M, 2014. Large multistate outbreak of Norovirus gastroenteritis associated with frozen strawberries, Germany. *Euro Surveillance* 2012; 19 (8): 1-9.
4. Blessington T, Theofel CG, Mitcham EJ, Harris L. Survival of foodborne pathogens on in shell walnuts. *International Journal of Food Microbiology.* 2013; 166 (3): 341-348.
5. Caponigro V, Piro F. Variation of microbial load and visual quality of ready-to-eat salads by vegetable tipe, season, processors and retailer. *Food Microbiology.* 2010; 27: 1071-1077.
6. Caslake LF, Connolly DJ, Menon V, Duncanson CM, Rojas R and Tavakoli J. Disinfection of contaminated water by using solar irradiation. *Journal Applied Environmental Microbiology.* 2004; 70: 1145-1150.
7. Caro T. Antipredator Defenses in Birds and Mammals. The University of Chicago Press, London. 2005: 117.
8. Chen Y, Evans P, Hammack ST, Brown EW, Macarasin D. Internalization of *Listeria monocytogenes* in whole avocado. *J. Food Protection.* 2016; 79 (8): 1440-1445.
9. Castillo A, Escartin E. Survival of *Campylobacter jejuni* on sliced watermelon and papaya. *J. Food Protection.* 1994; 57 (2): 166-168.
10. Coroneo V, Dessì S, Carraro V, Brandas V, Sanna C, Sanna A. Qualità microbiologica del processo di produzione dei vegetali di I Gamma (Lattuga). *Industrie Alimentari.* 2014; 542: 5-10.
11. CDC, 2002 S. Poona <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5146a2.htm>
12. CDC 2006 S. Typhimurium <https://www.cdc.gov/salmonella/2006/tomatoes-11-2006.html>
13. CDC 2006 E. coli O157:H7 <https://www.cdc.gov/ecoli/2006/spinach-10-2006.html>
14. CDC 2008 S. Litchfield <https://www.cdc.gov/salmonella/2008/cantaloupes-4-2-2008.html>
15. CDC 2010 E. coli O145 <https://www.cdc.gov/ecoli/2010/shredded-romaine-5-21-10.html>

16. CDC Update, 2012. Multistate Outbreak of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Newport in infections linked to cantaloupe. <https://iafp.confex.com/iafp/2013/webprogram/Paper3187.html>
17. <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/>.
18. <https://www.cdc.gov/salmonella/saintpaul-04-13/index.html>
19. EFSA, 2011 - <https://www.efsa.europa.eu/it/press/news/110705>.
20. EFSA, 2013 - Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. EFSA J., 11: 3241.
21. EFSA and CDC, 2013. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20153086645>.
22. EFSA Journal, 2014 - Scientific opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2; 12(12): 3937.
23. EFSA, 2016. Annual report of the Emerging Risks Exchange Network 2015. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1067/full>
24. Erickson M, Critzer F and Doyle M. 2010. Composting criteria for animal manure. Georgetown University Pew Produce Safety Project. <http://www.producesafetyproject.org/> Project. [http://www.producesafetyproject.org/\[Google Scholar\]](http://www.producesafetyproject.org/[Google Scholar]).
25. Falkenstein D. 2015. <http://www.foodpoisonjournal.com/foodborne-illness-outbreaks/a-2010-texas-celery-listeria-outbreak-sickened-10/#.WTVrpevyiM8>
26. Guo X, Chen J, Brackett RE. Survival of *Salmonellae* on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening. Applied and Environmental Microbiology. 2001; 67 (10): 4760-4764.
27. Guzman E *et al.*, 2013. <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/ee/v18n49/art20650.pdf>
28. Jacks A., Toikkanen S., 2013. Raw grated beetroot linked to several outbreaks of sudden-onset gastrointestinal illness, Finland 2010. Epidemiol. Infect., 141(8): 1640-1646.
29. Jeter C and Mathisse AG. Characterization of the Binding of Diarrheagenic Strains of *E. coli* to Plant Surfaces and the Role of Curli in the Interaction of the Bacteria with Alfalfa Sprouts. Molecular Plant Microbe Interactions. 2005; 18 (11): 1235-1242.
30. Jones S and Shortt R. 2010. Improving on-farm food safety through good irrigation practices. <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/10-037.htm>
31. Laidler MR, Tourdjman M, Buser GL, Hostetler T, Repp KK, Leman R, Samadpour M, Keene WE. *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of locally grown strawberries contaminated by deer. Clin Infect. Dis. 2010; 57 (8):1129-1134.
32. Maffei DF, Batalha EY, Landgraf M, Schaffner DW, Franco BDGM. Microbiology of organic and conventionally grown fresh produce. Brazilian Journal of Microbiology. 2016; 47: 99-105.
33. Matthews KR, Sapers GM, Gerba CP. Leafy vegetables. The Produce Contamination Problem. Causes and Solutions. Elsevier, New York. 2009: 165-187.
34. Materon L, Martinez-Garcia M, McDonald. Identification of sources of microbial pathogens on cantaloupe rinds from pre-harvest to post-harvest operation. World J. Microbiological Biotechnology. 2007; 23 (9): 1281-1287.
35. Nygård K, Lassen J, Vold L, Andersson Y, Fisher I, Löfdahl S, Threlfall J, Luzzi I, Peters T, Hampton M, Torpdahl M, Kapperud G, Avitsland P. Outbreak of *Salmonella* Thompson infections linked to imported rucola lettuce. Foodborne Pathog Dis. ;5(2):165-173. MANCA ANNO DI PUBBLICAZIONE
36. Parish ME, Beuchat LR, Suslow TV, Harris LJ, Garrett EH, Farber JN, Busta FF. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. Comprehensive Review in Food Science and Food Safety. 2003; 2: 161-173.
37. Pezzuto A, Belluco S, Losasso C, Patuzzi I, Bordin P, Piovesana A, Comin D, Mioni R and Ricci A. Effectiveness of Washing Procedures in Reducing *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* on a Raw Leafy Green Vegetable (*Eruca vesicaria*). Front. Microbiol. 2016: 1-7.
38. Pigeon JM, Vanbockstal C, Popoff MR, King LA, Deschamps B, Pradel G, Dupont H, Spanjaard A, Houdard A, Mazuet C, Belaizi B, Bourgeois S, Lemgueres S, Debbat K, Courant P, Quirin R, Malfait P. Two outbreaks of botulism associated with consumption of green olive paste, France. Euro Surveill. 2011; 16(49): 20035. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20035>
39. Rangel JM, Sparling PJ, Crowe C, Griffin PM and Swerdlow DL. Emerging Infectious Disease. 2005; 11: 603-608.
40. Söderström A, Osterberg P, Lindqvist A, Jönsson B, Lindberg A, BlideUlander S, Welinder-Olsson C, Löfdahl S, Kaijser B, De Jong B, Kühlmann-Berenzon S, Boqvist S, Eriksson E, Szanto E, Andersson S, Allestam G, Hedenström I, Ledet Muller L, Andersson Y, 2008. A large *Escherichia coli* O157 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce. Foodborne Pathogens and Disease. 2008; 5 (3): 339-349.
41. Solomon EB, Sima Y, Matthews KR. Transmission of *Escherichia Coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. Applied and Environmental Microbiology. 2002; 68: 397-400.
42. <https://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis-11-14/index.html>
43. <https://www.cdc.gov/salmonella/montevideo-03-16/index.html>
44. <https://www.cdc.gov/salmonella/reading-08-16/index.html>
45. <https://www.cdc.gov/salmonella/2006/tomatoes-11-2006.html>. <https://www.cdc.gov/salmonella/braenderup-08-12/index.html>.