

RAPPORTO TECNICO SCIENTIFICO 1/2011

ALTERAZIONI ORGANOLETTICHE NEGLI ALIMENTI CAUSATE DA PSEUDOMONADACEAE E POSSIBILI RICADUTE PER LA SANITA' PUBBLICA

Gruppo di lavoro: Silvia Marro, Bartolomeo Griglio, Alessandro Testa, Francesca Piovesan, Tiziana Civera.

1. IL CONTESTO

Nel corso del 2010, con grande risalto mediatico, sono stati portati all'attenzione dell'opinione pubblica alcuni casi di alterazioni cromatiche di mozzarelle (le cosiddette "mozzarelle blu"). Il fenomeno ha creato preoccupazione tra i cittadini e gli interventi dell'autorità giudiziaria hanno posto i servizi delle ASL, deputati al controllo, di fronte alla necessità di effettuare interventi in situazioni particolarmente critiche. Questo a causa della difficoltà nell'individuare l'effettiva fase in cui si è generata l'alterazione (legata al prodotto o alle modalità di gestione successive all'acquisto) ed dell'assenza di limiti previsti da normative per i microrganismi che causano il fenomeno.

Al fine di fornire un quadro aggiornato delle conoscenze su *Pseudomonas* spp., riconosciuto tra i batteri maggiormente coinvolti nelle alterazioni degli alimenti, si è redatto il presente rapporto scientifico.

2. *PSEUDOMONAS* SPP.

I batteri del genere *Pseudomonas* appartengono alla classe dei Gammaproteobacteria, e si presentano come bacilli, Gram negativi, diritti o lievemente incurvati, da 0,5 a 1,0 μm di diametro e 1,5-5,0 μm di lunghezza, solitamente mobili per uno o più flagelli, aerobi, con metabolismo strettamente respiratorio, chemiorganotrofi, incapaci di svilupparsi a pH inferiore a 4,5. *Pseudomonas* spp. è in grado di crescere in modo ottimale a 25°C, ma può moltiplicarsi anche a temperature di refrigerazione (psicrotollerante), costituendo fino al 90% della flora microbica totale di un alimento (De Jonghe *et al.*, 2010). Negli ultimi 20 anni sono stati sottoposti a numerosi cambiamenti tassonomici, non solo per quanto riguarda il numero di specie ma anche per i criteri impiegati. (Euzéby in <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/cvfrancais.html>). L'approccio oggi più promettente è legato a studi chemiotassonomici che comprendono esame dei profili proteici, composizione in acidi grassi e in poliamine, caratterizzazione dei siderofori e delle piovherine (Meyer *et al.*, 2002). Al momento attuale il genere *Pseudomonas* comprende oltre 100 specie, la maggior parte saprofita dell'acqua e del terreno.

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, in particolar modo pesci e uccelli (*Ps.anguilliseptica*, *Ps.chlorophis*, *Ps.aeruginosa*). Indicazioni complete possono essere reperite nella recente rassegna bibliografica pubblicata da Peix (*et al.*, 2009).

Pur avendo la maggior parte di *Pseudomonas* spp. un'origine ambientale, negli alimenti si osservano spesso specie diverse a seconda del substrato. Nel latte, come evidenziato da recenti lavori effettuati in Belgio, 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. In particolar modo *Ps.fragi* (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), *Ps.putida*, che può indurre gravi infezioni nella trota, *Ps.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 *Ps.fluorescens*, seguito da *Ps.putida* (Franzetti *et al.*, 2007).

3. PSEUDOMONAS SPP. e ALTERAZIONE DEGLI ALIMENTI

I batteri del genere *Pseudomonas* sono in grado di provocare negli alimenti numerosi fenomeni alterativi, come ad esempio la comparsa di odori e colorazioni anomali nelle carni.

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 possono conferire 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.

Il colore del pigmento può consentire di esprimere un sospetto sull'identificazione del microrganismo che ha colonizzato l'alimento, ma la certezza della correlazione difetto/batterio si può avere solo isolando dall'alimento il microrganismo e procedendo alla sua identificazione biochimica, sierologica o genomica.

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.cedrella* e *Ps.orientalis*. Solo *Ps.aeruginosa* risulta produttrice di piocianina.

Nella tabella seguente sono elencate le più frequenti alterazioni cromatiche degli alimenti, le specie di *Pseudomonas* responsabili e le principali fonti di isolamento.

COLORAZIONE	BATTERI RESPONSABILI	FONTE DI ISOLAMENTO	NOTE
GIALLO-BLU-VIOLA	<i>Ps.gessardii</i>	Acqua minerale naturale (Verhille, 1999; Peix <i>et al.</i> , 2009), acqua di processo (Cantoni <i>et al.</i> , 2006; Sarale <i>et al.</i> , 2010)	Responsabile di un caso di “coniglio blu” (Sarale <i>et al.</i> , 2010) e mozzarella con macchie giallo-violacee (Cantoni <i>et al.</i> , 2006)
GIALLO	<i>Ps.synxantha</i>	Latte amaro (Peix <i>et 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 (Peix <i>et 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 (Peix <i>et al.</i> , 2009)	
	<i>Ps.chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i>	Superfici (Peix <i>et al.</i> , 2009)	
ARANCIO CARICO	<i>Ps.aeruginosa</i>	Campioni clinici (Peix <i>et 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 (Peix <i>et 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 (Peix <i>et 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</i> biovar I e V	Serbatoi di pre-filtro, fanghi attivi, alimenti (Peix <i>et al.</i> , 2009)	Ha una bassa incidenza, sia nell’ambiente che negli alimenti
	<i>Ps.aeruginosa</i>	Campioni clinici (Peix <i>et al.</i> , 2009), acqua minerale (Legnani <i>et al.</i> , 1999; Casanovas-Massana <i>et al.</i> , 2010)	
BLU-VERDE	<i>Ps.fluorescens</i> biovar IV	Serbatoi di pre-filtro, fanghi attivi, alimenti (Peix <i>et 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) (Dabboussi <i>et al.</i> , 1999; Peix <i>et 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 (Peix <i>et al.</i> , 2009)	Responsabile di casi di “latte blu” (Vasut <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Ps.tolaasii</i>	Funghi coltivati (Peix <i>et al.</i> , 2009)	Responsabile di casi di “mozzarella blu”. Patogeno per funghi coltivati.
BLU INTENSO	<i>Ps.aeruginosa</i>	Campioni clinici (Peix <i>et 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, formaggio, mozzarella (sushi, carne ed insalata (Franzetti <i>et al.</i> , 2007)	Principali ceppi produttori di pigmenti fluorescenti all’interno del genere <i>Pseudomonas</i>

Tabella 1 – Chiazze cromatiche su alimenti, ceppi responsabili e fonti di isolamento

4. DIFFUSIONE

Pseudomonas sono batteri in grado di crescere in modo ottimale a 25°C, ma possono moltiplicarsi anche a temperature di refrigerazione (psicrotolleranti), costituendo fino al 90% della flora microbica totale di un alimento (De Jonghe *et al.*, 2011). Questa condizione molto selettiva può comportare una sovracrescita esponenziale del microrganismo in fasi di successivo abuso termico durante la commercializzazione ed in ambito domestico.

Ad esempio, 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.

In uno studio condotto 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 10⁵ ufc/g ha registrato un incremento fino a 10⁸ ufc/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).

Nel periodo compreso tra giugno ed agosto 2010, 26 campioni di mozzarelle oggetto dell'allerta attivata in seguito ad una segnalazione di "mozzarella blu" sono stati conferiti all'IZS Lazio e Toscana sede di Roma; 17 reperti di mozzarella provenivano da privati cittadini perché presentavano evidenti alterazioni della colorazione della superficie esterna, mentre altri 9 campioni venivano prelevati ufficialmente presso la grande distribuzione (Bogdanova *et al.*, 2010).

In 16 dei 26 campioni analizzati, è stato isolato *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 >10⁷ ufc/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 (>10⁶ ufc/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.

Una recente indagine dell'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 3,3x10³ a 2,6x10⁶ 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).

In un lavoro belga (De Jonghe *et al.*, 2011) è stato 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 psicotolleranti 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).

In un lavoro italiano pubblicato nel 1992 (Gennari e Dragotto, 1992) è stata esaminata 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*.

Nello stesso lavoro, 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. Infatti, 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:

% CAMPIONI CONTAMINATI	Principale specie di <i>Pseudomonas</i> isolata
Carne fresca (26%)	<i>Ps.fluorescens</i> V-1
Pesce fresco (40%)	
Pesce alterato (30%)	
Acqua (39%)	
Carne alterata (44%)	<i>Ps.lundensis</i>
Campioni lattiero-caseari (15%)	<i>Ps.fluorescens</i> I-1
Terreno (26%)	<i>Ps.putida</i> A

Tabella 2 – Biotipi e sottogruppi di *Pseudomonas* fluorescenti maggiormente isolati negli alimenti e nell'ambiente (Gennari e Dragotto, 1992)

5. 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 *Pseudomonas* spp.** rappresentando successivamente una delle fonti principali di contaminazione per i prodotti lattiero-caseari derivati. Un recente lavoro dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna (Finazzi *et al.*, 2011) ha appunto evidenziato un'elevata prevalenza (55%) di *Pseudomonas fluorescens* in campioni di latte crudo scelti casualmente, con livelli di concentrazione in alcuni casi considerevoli (6-7 log ufc/ml).

Un'altra frequente fonte di contaminazione degli alimenti può essere 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 (Van Der Kooij *et al.*, 1982; Legnani *et al.*, 1999), grazie alla formazione di un biofilm protettivo.

In un poster presentato al Convegno Nazionale AIVI del 2010, *Ps.gessardii* 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).

Pseudomonas spp. (tra cui *Ps.gessardii*) 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).

6. PATOGENICITÀ

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

Ps.fluorescens, appartenendo anche alla flora del cavo orofaringeo umano, può essere a volte responsabile di infezioni post-trasfusionali e respiratorie in persone debilitate o con difese organiche compromesse (Gershman *et al.*, 2008), anche se in questo caso il ruolo prevalente appartiene a *Ps.aeruginosa* particolarmente temuta nel campo delle infezioni ospedaliere.

Ps.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).

7. NORMATIVA

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 quindi non sono stati stabiliti limiti di accettabilità negli alimenti.**

Il solo riferimento normativo inerente *Pseudomonas* è contenuto nel D.l.vo 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.

Per quanto riguarda *Ps.fluorescens*, essendo un contaminante ambientale, potrebbe essere considerato un criterio di igiene del processo, alla stregua delle Enterobatteriacee, anche se non rientra tra i criteri di processo previsti dal Reg.(CE) n.2073/2005. Tuttavia, livelli elevati di *Ps.fluorescens* (> 7-8 log ufc/g), benché non pericolosi per il consumatore, potrebbero essere considerati tali da rendere l'alimento inadatto al consumo umano e quindi, in base all'articolo 14 comma 5 del Reg.(CE) n.178/2002, passibile di ritiro dal mercato.

La commercializzazione di prodotti in stato di alterazione rientra, inoltre, nella fattispecie prevista dall'articolo 5 delle Legge n.283/1962.

8. CONCLUSIONI

Alla luce di quanto esposto finora, **si ritiene non vi siano elementi per prevedere un programma di campionamento di routine per la ricerca di *Pseudomonas* spp. da parte della Sanità Pubblica.** Trattandosi di una problematica di prevalente interesse produttivo deve essere gestita dalla ditta nel proprio piano di autocontrollo.

D'altra parte, pur non afferendo alla sfera della salute pubblica, **le problematiche collegate a colorazioni anomale di alimenti, riportate con enfasi dai media, hanno assunto un forte impatto sulla percezione dei livelli di sicurezza alimentare da parte del consumatore.** I conseguenti interventi da parte delle Autorità competenti possono avere **pesanti ricadute economiche e commerciali per le imprese e devono essere pertanto modulati sulla base di valutazioni trasparenti e basati per quanto possibile su evidenze scientifiche.** E' quindi opportuno disporre di procedure per le Autorità competenti che si dovessero trovare in futuro ad affrontare e gestire problematiche di questo tipo in grado di assicurare quei criteri di uniformità ed appropriatezza previsti dal Reg.(CE) n.882/2004 per i Controlli Ufficiali.

Tenuto conto delle caratteristiche di *Pseudomonas* spp. e della bibliografia consultata (Ayres, 1960; Ingram et Dainty, 1971; Gill et Newton, 1978, Gennari et Dragotto, 1992, Bevilacqua et al., 2008; Vasut et al., 2009; HPA, 2009), a fronte di segnalazioni attendibili (tempi di acquisto, modalità di conservazione, etc...) di alterazioni di **formaggi** riconducibili al microrganismo, potrebbe essere ragionevole **individuare dei limiti. Tali valori dovrebbero discriminare tra l'accettabilità e la non accettabilità della partita a cui appartiene l'alimento che ha manifestato la colorazione anomala, al fine di poter valutare l'eventuale non idoneità al consumo del prodotto.**

Poiché per i microrganismi alteranti le "Linee guida generali sul campionamento del Codex CAC/GL 50-2004" indicano un piano di campionamento a tre classi, occorre individuare un ulteriore limite (m) che definisca l'accettabilità marginale, ovvero l'intervallo di carica microbica all'interno del quale si colloca un risultato solo parzialmente accettabile. Tali limiti sono individuati in 6 log ufc/g, per latte e prodotti a base di latte e in 5 log per carni fresche e lavorate e prodotti della pesca, valori che rappresentano il livello al di sotto del quale gli alimenti risultano, secondo la letteratura scientifica esaminata, ancora accettabili.

Nello stesso documento del Codex viene suggerito, ai fini della rappresentatività del campione, un protocollo di campionamento da effettuare su latte e prodotti lattiero-caseari appartenenti allo stesso lotto in confezioni integre (non sul prodotto aperto oggetto dell'esposto), articolato in 5 unità campionarie per aliquota, per due delle quali è permesso il superamento di (m), ma non di (M): **n= 5, c=2, m=10⁶, M=10⁸.**

Con le stesse modalità, potrebbero essere utilizzati quale riferimento per i prodotti della pesca e le carni fresche e lavorate, sempre tenendo conto della letteratura (IFST, 1997 e 1999) che evidenzia la loro maggiore deperibilità, i seguenti limiti: **n= 5, c=2, m=10⁵, M=10⁷.**

Pertanto potrebbe essere utile ricorrere, per la valutazione dell'accettabilità della partita, a piani di campionamento a tre classi (vedi tabella), fissando come M (limite di accettabilità) 8 log ufc/g di *Pseudomonas* spp. per i formaggi e 7 log ufc/g per carni e pesce: infatti al di sopra di tale valore è probabile che la matrice manifesti una marcata modificazione delle caratteristiche organolettiche.

PIANO DI CAMPIONAMENTO						
	n	c	m	M	Matrice	Metodo di analisi di riferimento
<i>Pseudomonas</i> spp.	5	2	5 log ufc/g	7 log ufc/g	Carni fresche e lavorate Prodotti della pesca	ISO 13720:2010
<i>Pseudomonas</i> spp.	5	2	6 log ufc/g	8 log ufc/g	Latte e prodotti a base di latte	ISO/TS 11059:2009 (IDF/RM 225:2009)

BIBLIOGRAFIA

1. Altinok I., Kayis S., Capkin E. (2006) "Pseudomonas putida infection in rainbow trout". *Aquaculture*, 261:850–855.
2. Angelini N.M., Seigneur G.N. (1988) "Disease of the fins of *Rhamdia sapo*. Isolation of the etiological agents and experimental infection". *Revista Argentina de Microbiologia*, 20:37–48.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Bilei S., Bogdanova T., Flores Rodas 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.
7. Bogdanova T., Flores Rodas 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.
8. 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.
9. Cantoni C., Marchisio E., Galli M. (2000) "Causa della colorazione blu-verde delle mozzarelle" *Industrie Alimentari*, 39: 586-588.
10. Cantoni C., Milesi S., Iacumin L. (2006) "*Kocuria rhizophila* *Pseudoclavibacter helvolus* e *Pseudomonas putida* quali germi alteranti i prodotti lattiero-caseari". *Industrie alimentari*, Dicembre, 1261-1263.
11. 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.
12. Cantoni C., Stella S., Cozzi M., Iacumin L., Comi G. (2003) *Industrie Alimentari*, 42: 840-843.
13. Cantoni C., Stella S., Ripamonti B., Marchese R. (2001) *Industrie Alimentari*, 40: 33-35.
14. Cousin M. A. (1982) "Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review". *Journal of Food Protection*, 45:172–207.
15. 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.
16. Datta N., Deeth H. C. (2001) "Age gelation of UHT-milk – a review". *Food and Bioproducts Processing*, 79:197–210.
17. 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.
18. 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.
19. Doyle M.P., Beuchatz L.R., Mornville T.J. (2001) *Food microbiology. Fundamentals and Frontiers*, second edition. ASM Press, Washington D.C.
20. Drosinos E. H., Board R. G. (1995) "Microbial and physicochemical attributes of minced lamb: sources of contamination with pseudomonads". *Food Microbiology*, 12: 189-197.
21. 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.

22. Fairbairn D.J., Law B.A. (1987) "The effect of nitrogen and carbon sources on proteinase production of *Pseudomonas fluorescens*". Journal of Applied Bacteriology, 62: 105-113.
23. Finazzi G., Cosciani Cunico E., Daminelli P., Losio M.N. (2011) "Valutazione della dinamica di sopravvivenza di *Pseudomonas fluorescens* in confezioni di mozzarella e capacità di provocare alterazioni di colore nel prodotto". Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
24. Franzetti L., Scarpellini M. (2007) "Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods". Annals of Microbiology, 57 (1): 39-47.
25. General Guidelines on sampling CAC/GL 50-2004.
26. Gennari M., Dragotto F. (1992) "A study of the incidence of different fluorescent *Pseudomonas* species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water". Journal of Applied Bacteriology, 72: 281-288.
27. Gershman M.D. et al. (2008) "Multistate outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bloodstream infection after exposure to contaminated heparinized saline flush prepared by a compounding pharmacy". Clin. Infect. Dis., 47 (11): 1372-1379.
28. Giaccone V. (2010) "*Pseudomonas* e prodotti lattiero-caseari" Medicina Veterinaria Preventiva, Settembre, 32, supplemento.
29. Gill C. O., Newton K. G. (1978) "The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures". Meat Science, 2: 207-217.
30. Health Protection Agency (2009) "Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods Placed on the Market", Health Protection Agency, London.
31. Huang L., Chen M.M., Wang W., Hu H.B., Peng H.S., Xu Y.Q., Zhang X.H. (2011) "Enhanced production of 2-hydroxyphenazine in *Pseudomonas chlororaphis* GP72". Applied Microbiology Biotechnology, 89(1):169-77.
32. IFST Professional Food Microbiology Group (1997) "Development and use of microbiological criteria for foods. Guidance for those involved in using and interpreting microbiological criteria for foods". Food Science and Technology Today, 11 (3): 137-176.
33. IFST, Institute of Food Science and Technology (1999) "Development and use of microbiological criteria for foods". ISBN 0 905367.
34. Ingram M., Dainty R. H. (1971) "Changes caused by microbes in spoilage of meats". Journal of Applied Bacteriology, 34: 21-39.
35. Laura Franzetti L., Scarpellini M. (2007) "Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods". Annals of Microbiology, 57 (1): 39-47.
36. Legnani P., Leoni E., Rapuano S., Turin D., Valenti C. (1999) "Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study". International Journal of Food Microbiology, 53: 153-158.
37. Meyer J.M., Geoffroy V.A., Baida N., Gardan L., Izard D., Lemanceau P., Achouak W., Palleroni N. (2002) "Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas*". Applied Environmental Microbiology, 68: 2745-2753.
38. Mucchetti G., Neviani E. (2006) "La mozzarella di Bufala Campana in Microbiologia e Tecnologia Lattiero-casearia. Qualità e sicurezza". Tecniche nuove, Milano
39. Pedonese F., Nuvoloni R., D'Ascenzi C., Paterni L., Forzale F., Gerardo B., Rindi S. (2007) "Evoluzione dei parametri microbiologici di ricotta industriale durante la shelf-life (Evolution of microbiological parameters of industrial ricotta cheese during the shelf-life)". Annali Facoltà di Medicina Veterinaria, 60: 289-296.
40. Sarale A., Grassi M.A., Civera T. (2010) "*Pseudomonas gessardii* come causa di pigmentazione anomala in carcasce di coniglio". XX Convegno AIVI, Copanello 16-18 giugno 2010.
41. Smirnov, V.V., Kiprianova, E.A. (1990) "Bacteria of *Pseudomonas* Genus" Naukova Dumka, Kiev, USSR: 100-111.
42. Soncini G., Marchivio G., Cantoni C. (1998) "Causa delle alterazioni cromatiche di mozzarelle". Industrie Alimentari, 37: 850-855.

43. Van Der Kooij D., Oranje J.P., Hijnen W.A. (1982) "Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in tap water in relation to utilization of substrates at concentration of a few micrograms per liter". *Applied Environmental Microbiology*, 44: 1086–1095.
44. Vasut R.G., Dima Robechi M. (2009) "Food contamination with psychrophilic bacteria". *LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE MEDICINĂ VETERINARĂ Timisoara*, vol. XLII, 2: 325-330.
45. Verhille S., Batda N., Dabboussi F., Hamze M., Izard D., Leclerc H. (1999) "*Pseudomonas gessardii* sp. nov. and *Pseudomonas migulae* sp. nov., two new species isolated from natural mineral waters" *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 1559-1572.
46. Völker S., Schreiber C., Kistemann T. (2010) "Drinking water quality in household supply infrastructure - A survey of the current situation in Germany". *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213: 204–209.
47. Wiedmann M., Weilmeier D., Dineen S.S., Ralyea R.M., Boor K.J. (2000) "Molecular and Phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk". *Applied Environmental Microbiology*, 66 (5): 2085-2095.
48. Zanchetta S. (2006) "Qualità microbiologica del latte e difetti del formaggio". *Notiziario ERS* 2/2006: 27-31.