



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche della Prevenzione
nell'Ambiente e nei Luoghi di Lavoro

**PERICOLI ALIMENTARI NEL SUSHI:
RICERCA DI *BACILLUS CEREUS* NEL
RISO**

**FOOD HAZARDS IN SUSHI:
SEARCH FOR *BACILLUS CEREUS* IN
RICE**

Relatore: Chiar.mo

Prof. Francesco Renzi

Tesi di Laurea di:

Silvia Macrillante

Anno Accademico 2018 – 2019

*La vita è questa.
Niente è facile
e nulla è impossibile.*

INDICE

INTRODUZIONE.....pag. 1

PARTE PRIMA: INFORMAZIONI GENERALI SUL BACILLUS

CEREUS E METODI DI PREVENZIONEpag. 15

Capitolo 1

1. DESCRIZIONE.....pag. 15

1.1 Tipologie di *Bacillus cereus*.....pag. 17

1.2 Crescita e sopravvivenza del *Bacillus cereus*
negli alimenti.....pag. 18

1.3 Limiti di legge.....pag. 20

Capitolo 2

2. TOSSICOLOGIA.....pag. 25

2.1 Tossinfezioni alimentari.....pag. 27

2.2 Focolai di tossinfezione.....pag. 29

2.3 Sistema rapido di allerta per alimenti
e mangimi (RASFF).....pag. 31

2.4 Ruolo dell'EFSA.....pag. 34

Capitolo 3

3. PREVENZIONE.....pag. 37

3.1 Procedure HACCP.....pag. 37

3.2 Metodi di prevenzione e controllo.....pag. 39

3.2.1 *Controllo delle temperature*.....pag. 39

3.2.2 *Controllo del pH*.....pag. 40

3.2.3 *Corretta prassi igienica*.....pag. 41

3.3 Formazione del personale.....pag. 41

3.4 Sterilizzazione.....pag. 42

PARTE SECONDA: CAMPIONAMENTI E ANALISI.....pag. 45

Capitolo 4

4. SCOPO DELLA TESI.....pag. 45

Capitolo 5

5. MATERIALI E METODI.....pag. 47

5.1 Preparazioni ingredienti.....pag. 47

5.1.1	<i>Riso</i>	pag. 48
5.1.2	<i>Salsa di aceto</i>	pag. 49
5.2	Campionamento.....	pag. 50
Capitolo 6		
6.	RISULTATI.....	pag. 53
	<u>DISCUSSIONE</u>	pag. 57
	<u>CONCLUSIONI</u>	pag. 66
	BIBLIOGRAFIA	pag. 70
	<i>Ringraziamenti</i>	pag. 78

INTRODUZIONE

La scarsità di tempo a disposizione e l'abitudine nel cucinare meno si riflettono in una nuova consuetudine: l'utilizzo di piattaforme di food delivery. I cibi più ordinati nel 2018 sono stati i Poke Bowl, ciotole contenenti pesce crudo e altri ingredienti, che hanno rappresentato la tendenza di consumo più importante (1). Secondo una recente ricerca di Just eat, in tutta Italia e nel mondo, la cucina nipponica è al terzo posto tra le più ordinate a domicilio: dopo pizza e hamburger, con una crescita del 70%, dal 2017 ai primi cinque mesi del 2018 (2). In molti Paesi occidentali, come anche in Italia, si è verificata una progressiva diffusione di esercizi di ristorazione che somministrano questo tipo di alimento a base di pesce crudo.

Il sushi è un piatto generalmente associato alla cucina giapponese, ma in realtà non ha origini nipponiche. Infatti la storia del sushi è antichissima: le prime tracce ci sono già nel 3500 a.C. e non in Giappone, bensì in Thailandia. In varie zone del sud est asiatico, era diffuso un particolare metodo di conservazione del pesce, il quale veniva eviscerato, salato e posto in mezzo a riso cotto. La fermentazione del riso

provocava l'aumento dell'acidità dell'ambiente in cui si trovava il pesce che poteva così durare anche vari mesi, essere trasportato e stoccato. Al momento di consumare il pesce così conservato il riso veniva eliminato. Successivamente tramite viaggiatori cinesi e coreani, questa tecnica di conservazione è arrivata in Giappone e da qui iniziarono molteplici rielaborazioni. Infatti si incominciò a non buttare più il riso fermentato, ma a consumarlo assieme al pesce (piatto tipico che prende il nome di Namanare). Il palato giapponese era ormai abituato ad apprezzare il particolare gusto del pesce semicrudo assieme a riso acidulo e proprio per questo si incominciò a riprodurre questo tipo di abbinamento con l'aggiunta di aceto al riso bollito, verdure e altri ingredienti. Era ancora qualcosa di abbastanza diverso dal sushi che si consuma oggi (3). Nel 1923, un tremendo terremoto e il devastante incendio che seguì, distrussero quasi completamente Tokyo. La successiva opera di ricostruzione richiamò nella capitale maestranze e manovalanze da tutto il Giappone che impararono presto ad apprezzare questo tipico piatto, contribuendo alla sua diffusione a livello nazionale (4). Si diffonde rapidamente anche in tutta Europa e nel resto del mondo, tanto che all'inizio degli anni '80 nascono i primi ristoranti

giapponesi e sushi bar negli Stati Uniti. In Italia invece il sushi si è affermato tardivamente, infatti la sua diffusione ha avuto inizio verso la fine degli anni '80 (5). Nel 1972 infatti, fu fondato il primo ristorante giapponese in Italia, precisamente a Roma. Il successo mondiale della cucina giapponese è rappresentato dai 118.000 ristoranti ad essa ispirata, dei quali oltre 3.000 solo in Italia, con Milano in testa alla classifica, seguita da Roma e Torino (Figura 1). Di seguito in classifica troviamo, Genova in quarta posizione, Bologna, Firenze, Napoli, Palermo e Verona.

I rotolini di riso e pesce crudo hanno conquistato proprio tutti specialmente i ragazzi, tanto da trasformarsi in una delle specialità etniche più amate. Le donne in particolare, sono le consumatrici più assidue, infatti sono loro a ordinare sushi a domicilio per quasi il 60% (6).

La cucina giapponese oltretutto, è stata riconosciuta come patrimonio dell'umanità dell'UNESCO nel 2013. Proprio a garanzia dei consumatori, il Ministero dell'Agricoltura del Giappone ha dato il via ad una sorta di “bollino blu” per ristoranti o punti vendita giapponesi all'estero che rispettano precisamente la tradizione culinaria giapponese. Il sistema di certificazione è denominato “Japanese Food

Supporter” e vi possono aderire volontariamente aziende private all'estero, compresi ristoranti o enoteche, lounge bar, punti vendita specializzati, che promuovono l'utilizzo e la diffusione di ingredienti di origine giapponese. Il certificato ha una validità di due anni e bisogna avere dei requisiti precisi per ottenerlo. I ristoranti, devono garantire un'ampia offerta di piatti preparati con ingredienti giapponesi e una selezione di bevande alcoliche prodotte in Giappone, ma anche qualità del pesce, tecnica di preparazione, conoscenza degli ingredienti e di presentazione dei piatti (7) (8).

Il sushi rappresenta un prodotto alimentare da poter gustare sia seduti ad un tavolo di ristorante o a casa propria, ed è diventato talmente famoso che anche i supermercati offrono comode vaschette da portare a casa. Costituisce un insieme di pietanze diverse tra loro per ingredienti utilizzati, assemblaggi, forma e sapore, un tripudio di sapori dove il riso è la base fondamentale, le alghe Nori un accompagnamento comune a cui si aggiungono pesce fresco, frittatine, uova di pesce, verdure, carne, il tutto accompagnato da zenzero, wasabi e salsa di soia.

Le diverse tipologie sono (9) (10):



Hosomaki: Piccoli rotolini con alga Nori esterna e all'interno pesce e riso.

Futomaki: Rotoli con alga Nori esterna, che contengono riso e diversi ingredienti all'interno.



Gunkan nigiri: Gunkan significa barca, di forma ovale, contenente riso e ripieno che sporge verso l'alto, con alga Nori che unisce il tutto.

Temaki: Cono in alga Nori, ripieno di riso con la farcitura che sporge leggermente dal bordo. Pensato per essere mangiato con le mani come un cono gelato.



(10)



Onigiri: Palla di riso ovale o triangolare, con alga Nori all'esterno e ripieno di sgombro, salmone affumicato, frutta o verdura, tempura, caviale o carne.

Nigiri: Pezzi di pesce su polpettine di riso. Può essere presentata con una striscia di alga Nori per legare il pesce al riso.



Uramaki: Rotoli con alga Nori e farcitura all'interno, mentre il riso si trova all'esterno, spesso cosparso di piccoli semi di sesamo o

microscopiche uova di pesce.

Sashimi: (senza riso)
Fette di pesce servito crudo o in salamoia. Può essere presentato con wasabi e zenzero sul lato.



Di seguito vengono riportate le città italiane che consumano sushi in maggiore quantità e quali sono le tipologie di pietanze più gettonate (Figura 1).

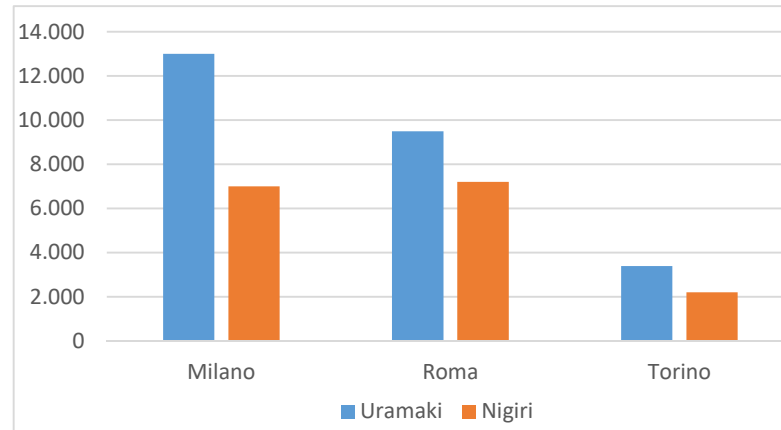


Figura 1. Tipologie di sushi e città italiane che presentano dati di consumo maggiori (11).

Oltre alla composizione di queste pietanze, è importante conoscere i rischi associati, come la presenza di patogeni che possono causare malattie nell'uomo. Le zoonosi legate al consumo di pesce crudo sono poco studiate rispetto ad altre malattie parassitarie, nonostante il significativo aumento nell'ultimo ventennio. L'aumento del consumo di prodotti ittici ad oggi corrisponde per lo più a tendenze salutiste, orientate a scegliere alimenti facilmente digeribili, con buone caratteristiche nutrizionali come il pesce azzurro, ricco di omega 3 e acidi grassi poliinsaturi (prevenzione dell'insorgenza delle aritmie cardiache). Una delle zoonosi

parassitarie più emergenti è l'Anisakidosi, causata da **Anisakis** (12) (13). Elminto (verme) della famiglia dei Nematodi, con forma allungata, estremità assottigliate e sessi distinti, l'Anisakis si trova allo stadio adulto nell'intestino dei grossi mammiferi marini quali balene, delfini, leoni marini, foche e degli uccelli che si nutrono di pesci. Le uova rilasciate in acqua dai mammiferi maturano e le larve infettano i piccoli crostacei, i quali vengono ingeriti dagli ospiti intermedi come pesci e cefalopodi. Nei pesci le larve si localizzano nel fegato, ovaio, stomaco ed intestino, dove tendono a incistarsi e ad assumere una caratteristica forma a spirale. L'uomo è un ospite accidentale del parassita, che si infetta consumando pesce crudo o poco cotto parassitato. I possibili sintomi sono rappresentati da dolori addominali, nausea, vomito, diarrea, febbre lieve, feci con muco e sangue. La normativa europea impone a ristoranti e sushi-bar che somministrano pesce crudo di congelare il prodotto fino a -20°C per mezzo dell'abbattitore termico (strumento in grado di abbassare rapidamente la temperatura degli alimenti) e di mantenerlo a tale temperatura per un minimo di 24 ore (14) (15). Nel caso invece di consumo domestico, non avendo l'abbattitore, per inattivare eventuali larve di Anisakis si deve congelare il pesce

in un freezer (contrassegnato con tre o più stelle) a temperature ancora più basse (-18°C in 96 ore) (16). Un altro agente causa di malattia nell'uomo che potrebbe essere presente nel sushi, è rappresentato dalla *Listeria monocitogenes* (17). Appartenente ai batteri Gram-positivi, ubiquitario nell'ambiente e presente in numerose specie di animali come mammiferi, uccelli, pesci. Presenta una forma bastoncellare, molto resistente all'essiccamento, surgelazione e calore. Causa la listeriosi, una malattia che colpisce l'uomo e gli animali. Seppur rara, è spesso grave, con elevati tassi di ricovero ospedaliero. L'infezione dura tra i 3 e i 70 giorni. Questo batterio può trovarsi nel terreno, nelle piante e nelle acque e di conseguenza gli animali che sono a contatto con questi, possono essere portatori del batterio. Il consumo di cibo o mangime contaminato è la principale via di trasmissione per l'uomo e gli animali. La listeriosi può assumere due forme:

- diarroica, che si manifesta nel giro di poche ore dall'ingestione;
- invasiva o sistemica, che attraverso i tessuti intestinali e il flusso sanguigno si diffonde sviluppando forme più acute di sepsi, encefaliti e meningiti.

Nel pesce inoltre, possono essere presenti anche altre tossine come l'**Istamina** (18), che causa la così detta "sindrome sgombroide", un'intossicazione alimentare che si può manifestare in seguito al consumo di pesce e prodotti derivati contenenti elevate quantità di istamina. Questa molecola si forma dalla denaturazione dell'amminoacido istidina che è naturalmente presente in forma libera nella muscolatura di varie famiglie di pesci marini. In particolare le quote più elevate di istidina sono presenti nel tessuto muscolare di alcune specie ittiche a carne rossa quali tonni, sgombri, sardine, aringhe e acciughe. Una piccola parte di istamina si sviluppa nei tessuti di questi pesci con il diminuire della freschezza, mentre la maggior parte viene prodotta dalla proliferazione di batteri che, in caso di conservazione impropria nella fase di stoccaggio del pescato e dei prodotti derivati o per uno scarso rispetto delle condizioni igieniche nella trasformazione e nelle successive fasi di conservazione, possono indurre la formazione di elevate quantità di istamina in grado di causare anche gravi casi di intossicazione alimentare nel consumatore. L'istamina è una sostanza termostabile, una volta formatasi non viene inattivata dalla cottura e neanche dalle elevate temperature di sterilizzazione.

La tossina non conferisce al prodotto odori o sapori particolari e quindi l'esame sensoriale del consumatore non può fornire elementi per accertare la presenza o l'assenza della tossina. I sintomi sono generalmente di lieve entità e possono essere facilmente confusi con quelli di una allergia alimentare. Quelli più comuni sono eritema diffuso, bruciore orale, iperemia congiuntivale, nausea, vomito, diarrea, cefalea, crampi addominali. Le forme più gravi (rare) si possono manifestare con anche broncospasmo, dispnea, crisi asmatiche, ipotensione, palpitazioni, ischemia miocardica, fino al collasso cardio-circolatorio.

All'interno del pesce crudo non troviamo solo microrganismi tossici, ma anche sostanze del tutto diverse, come i **metalli pesanti** (19) (20). Sostanze altamente cancerogene per l'uomo. Infatti i metalli come arsenico, cadmio, piombo e mercurio sono composti chimici che esistono in natura e che possono trovarsi nell'ambiente a varie concentrazioni nel terreno, nell'acqua e nell'atmosfera e possono trovarsi anche nei cibi come residui. La loro concentrazione può essere elevata a seguito di attività umane, quali l'allevamento, l'industria e i gas di scarico di autoveicoli oppure a causa di una contaminazione avvenuta durante la lavorazione e la

conservazione degli alimenti. L'accumulo nell'organismo umano di queste sostanze, può causare nel tempo effetti molto dannosi e portare anche alla morte.

Il sushi però, non è un piatto costituito solo da pesce crudo, bensì anche da riso di cui sono composte più tipologie di pietanze. Risulta quindi molto importante considerare anche un altro pericolo, rappresentato da uno dei batteri che può svilupparsi al suo interno, ovvero il *Bacillus cereus*, batterio diffuso nell'acqua, nell'aria, nel suolo, nei vegetali, nel materiale fecale di uomo ed animali e nei prodotti alimentari. In particolare, per quanto riguarda gli alimenti, può essere rinvenuto in riso, cereali e spezie che contengono amido, di cui si nutre il batterio. La germinazione di questo patogeno si ha a causa di errate metodiche di raffreddamento e conservazione a seguito della cottura. Può causare malattie nell'uomo che possono risolversi nel giro di qualche giorno, ma può portare anche alla morte se non trattato.

Questa tesi nello specifico, si presenta divisa in due parti.

La prima parte presenta una descrizione generale del batterio, considerando anche la natura, lo sviluppo e la diffusione delle specie tossigene, responsabili di tossinfezioni alimentari.

La seconda prevede una parte più tecnica, in cui vengono descritte le modalità del campionamento di riso presso alcune strutture produttrici di sushi e i risultati ottenuti dalle analisi dei campioni, eseguite dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche con sede a Tolentino.

PARTE PRIMA

CAPITOLO 1

1. DESCRIZIONE

Sono ormai noti, a tutti gli appassionati di sushi, i rischi connessi al pesce crudo. Al contrario però, sono poco conosciuti quelli che possono essere presenti nel riso bollito o cotto a vapore, che viene fatto raffreddare ed utilizzato nella preparazione di alcune pietanze della cucina giapponese. Un microrganismo che può svilupparsi al suo interno è il *Bacillus cereus*

(21) (22), il quale per sopravvivere si nutre di



amido. Batterio della famiglia dei Gram-positivi, di forma bastoncellare, aerobio facoltativo, sporigeno, in grado quindi di

produrre spore, cellule riproduttive munite di un involucro resistente che consente la sopravvivenza e la diffusione del germe per lungo tempo e in condizioni ambientali sfavorevoli. Le spore hanno uno strato esterno di cherotina che le rende estremamente resistenti al calore, alle radiazioni, all'essiccazione, ai disinfettanti e ad altre sostanze chimiche (24). Data la loro resistenza sono difficili da eliminare rappresentando un importante fonte di contaminazione degli alimenti.

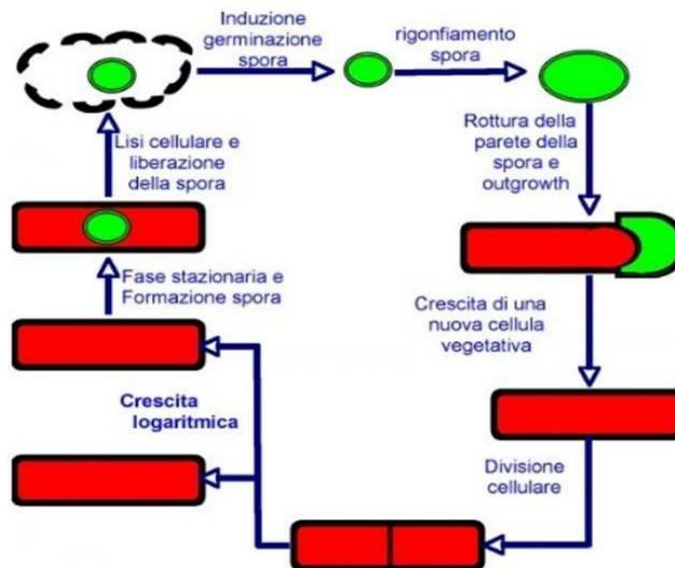


Figura 2. Ciclo di sviluppo di un batterio sporigeno (24).

Largamente diffuso in natura e può essere rinvenuto nell'acqua, nell'aria, nel suolo, nei vegetali, nel materiale fecale di uomo ed animali e nei prodotti alimentari. Alcune specie possono anche far parte della normale flora batterica intestinale dell'uomo e di altri animali.

1.1 Tipologie di *Bacillus cereus*

In relazione alla forma e alla posizione dell'endospora il genere *Bacillus* può essere distinto in 3 gruppi morfologici (25):

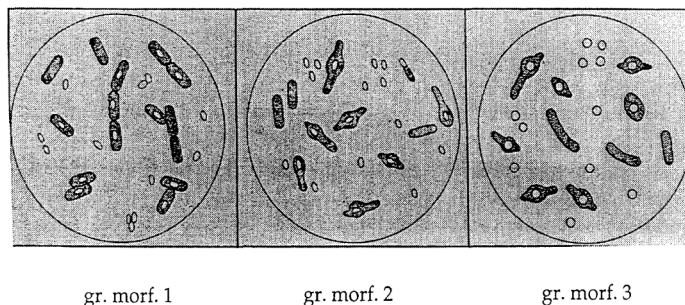


Figura 3. Diverse morfologie del *Bacillus cereus*.

Gruppo morfologico 1: spora centrale o subterminale, non rifrangente, non deformante la cellula microbica. Comprende la maggior parte dei patogeni che possono essere presenti

negli alimenti (*B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. anthracis*).

Gruppo morfologico 2: spora centrale o subterminale, ovoidale, rifrangente a parete spessa che deforma la cellula batterica. Comprende i patogeni che solo occasionalmente possono essere presenti negli alimenti (*B. brevis*).

Gruppo morfologico 3: spora terminale, sferica, rifrangente a parete spessa, che dà alla cellula batterica l'aspetto di una spilla. Comprende solo 2 specie (*B. sphaericus*, *B. pasteurii*).

1.2 Crescita e sopravvivenza del *Bacillus cereus* negli alimenti

Il *Bacillus cereus* non è un microrganismo competitivo, cresce bene dopo cottura, ovvero durante la fase di raffreddamento. Il trattamento termico provoca la germinazione delle spore che crescono a temperature comprese tra 7 e 8°C e

50 e 55°C, con una temperatura ottimale di crescita a 37°C. Il valore minimo di pH al quale si può avere crescita di *Bacillus cereus* non è standard ma dipende soprattutto dal tipo di alimento preso in considerazione. Secondo uno studio riportato dal National Center for Biotechnology Information, il valore minimo di pH al di sotto del quale sicuramente non c'è crescita microbica e quindi del *Bacillus cereus* risulta 4,6 (46), tuttavia può succedere che in alcune matrici, questo valore si abbassi a pH 4,35 (26), come riportato anche dal Food Safety Authority of Ireland, il quale prevede un pH di 4,3 (27). Il valore di aw (acqua libera) che può far verificare la crescita del *Bacillus cereus* negli alimenti è 0,95 (26), quindi risulta importante che l'aw sia sempre inferiore a tale valore, così che non possa verificarsi la crescita microbica. Le spore sono più resistenti al calore secco rispetto a quello umido e sono più resistenti nei

cibi oleosi o grassi. Al contrario le cellule vegetative di *Bacillus cereus* non hanno una elevata resistenza al calore e vengono distrutte con i normali trattamenti termici che inattivano tutti i batteri che non producono spore. In genere si riducono rapidamente nell'acidità dello stomaco, tuttavia alcune possano sopravvivere a seconda del tipo di alimento e dal livello di acidità del succo gastrico. Le spore invece sono abbastanza resistenti al succo gastrico (tra pH 1 e pH 5,2).

1.3 Limiti di legge

I limiti di legge per la sicurezza alimentare relativi al *Bacillus cereus*, sono regolamentati dal Regolamento (CE) 2073/2005 (28) e successive modifiche apportate dal Regolamento (CE) 1441/2007 (29) secondo cui, al superamento dei limiti definiti, il prodotto deve essere considerato non conforme al consumo e attuate misure correttive. Vengono

riportati di seguito i limiti di riferimento previsti per *Bacillus cereus* presunto nel Regolamento (CE) 2073/2005.

▼MI

Categoria alimentare	Microorganismi	Piano di campionamento (1)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio	Azione in caso di risultati insoddisfacenti
		n	c	m	M			
2.2.11. Alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai sei mesi	<i>Bacillus cereus</i> presunto	5	1	50 ufc/g	500 ufc/g	EN/ISO 7932 (10)	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione. Prevenzione della ricontaminazione. Selezione delle materie prime

Figura 4. *Bacillus cereus* presunto. Reg. CE 2073/2005.

▼MI

Interpretazione dei risultati delle prove

I limiti indicati si riferiscono a ogni unità campionarie sottoposta a prova.

I risultati delle prove dimostrano la qualità microbiologica del processo esaminato.

Enterobatteriacee in alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai 6 mesi e alimenti di proseguimento in polvere:

- soddisfacente, se tutti i valori osservati indicano l'assenza del batterio,
- insoddisfacente, se si rileva la presenza del batterio in una delle unità campionarie.

E. coli, enterobatteriacee (altre categorie alimentari) e stafilococchi coagulasi-positivi:

- soddisfacente, se tutti i valori osservati sono pari o inferiori a m,
- accettabile, se un massimo di c/n valori è compreso tra m e M e i restanti valori osservati sono pari o inferiori a m,
- insoddisfacente, se uno o più valori osservati sono superiori a M o più di c/n valori sono compresi tra m e M.

Bacillus cereus presunto in alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai 6 mesi:

- soddisfacente, se tutti i valori osservati sono pari o inferiori a m,
- accettabile, se un massimo di c/n valori è compreso tra m e M e i restanti valori osservati sono pari o inferiori a m,
- insoddisfacente, se uno o più valori osservati sono superiori a M o più di c/n valori sono compresi tra m e M.

Figura 5. Interpretazione dei risultati delle prove secondo il Reg. CE 2073/2005.

Il Regolamento distingue i Criteri Microbiologici in (27):

- Criteri di igiene del processo: indicano se il processo produttivo viene eseguito secondo una Corretta Prassi Igienica.

- Criteri di sicurezza alimentare:
definiscono l'accettabilità di un prodotto alimentare in termini di sicurezza microbiologica.

Altri valori limite, riferiti a matrici alimentari diverse da quella indicata nel Regolamento (CE) 2073/2005 (28), attribuiti al *Bacillus cereus* presunto, vengono riportati nel DGR 1508/2016 della regione Marche, il quale prevede, oltre ai prodotti in polvere, altri alimenti. In questo decreto sono riportati dei valori, precisamente nell'Allegato 7, relativi alla combinazione microrganismo/matrice alimentare, al fine di uniformare sul territorio nazionale il controllo ufficiale, l'interpretazione e la gestione degli esiti analitici. Tali valori possono essere considerati per valutare *criteri di igiene di processo* o di *sicurezza alimentare*.

- Qualora i risultati delle analisi su un campione, ad esclusione del campionamento in aliquota unica con analisi non ripetibile, evidenzino il mancato rispetto dei criteri di sicurezza del Regolamento (CE) 2073/2005 (28) o dei criteri di sicurezza supplementari indicati nell'Allegato 7, il laboratorio avvia le procedure per la ripetizione/revisione di analisi, limitatamente a vari parametro/i non conformi.
- Qualora, invece, vengano superati i limiti previsti dal Regolamento (CE) 2073/2005 (28) per i criteri di igiene di processo e/o i valori guida per gli ulteriori criteri di igiene di processo previsti nell'Allegato 7, non si procede in automatico ad effettuare alcuna ripetizione. In questo caso sulla base del risultato, l'Autorità Competente effettuerà le opportune verifiche sul processo di produzione e sulle misure messe in atto

dall'operatore del settore alimentare e
adotterà gli eventuali provvedimenti.

Inoltre, nei casi di malattie trasmesse dagli
alimenti (MTA), nel corso di episodi di
tossinfezioni alimentari, per i metodi analitici ed
i limiti di accettabilità, si può far riferimento
all'Allegato 8 che prevede “Accertamenti
analitici di microrganismi e loro tossine
responsabili di Malattie Trasmesse dagli
Alimenti (MTA)”. L'Allegato 8 indica che, al
superamento di certi limiti, si impone la ricerca
delle tossine, diventando così un criterio di
sicurezza e non solo di igiene.

Capitolo 2

2. TOSSICOLOGIA

Il *Bacillus cereus* è in grado di causare due tipi di malattie; la sindrome emetica che determina intossicazione e la sindrome diarroica che provoca tossinfezione (30) (31).

- La forma **emetica** è determinata dalla produzione di una tossina sintetizzata durante la fase di sporulazione. Compare entro 30 minuti o 6 ore dall'ingestione del pasto con vomito, dolori addominali e più raramente diarrea. Gli alimenti più incriminati sono il riso ed i prodotti contenenti amido.
- La forma **diarroica** è dovuta alla produzione di una tossina secreta dal batterio a livello intestinale. Si manifesta dopo 6-16 ore dall'assunzione del cibo con diarrea acquosa, dolori addominali e nausea. Il vomito è molto raro. Le pietanze incriminate sono molteplici e fra queste ricordiamo carne, vegetali, purè di patate, formaggio e gelati.

La tossina diarroica è una proteina inattivata dalla tripsina. Viene per lo più prodotta nel transito intestinale dopo ingestione di alimenti contaminati.

La tossina emetica invece, è un piccolo peptide estremamente resistente al calore, al pH (2-11) ed alla digestione enzimatica.

L'organismo umano è in grado di difendersi dalle infezioni da *Bacillus cereus*: solo quando l'alimento contiene un numero eccessivo di tossine o batteri, questi possono prendere il sopravvento e produrre dei danni. La dose minima infettante è di 10^3 UFC/g, anche se la maggior parte degli alimenti responsabili dell'intossicazione, presenta un livello di contaminazione di almeno 10^6 UFC/g.

Le malattie nell'uomo in genere, sono causate da alimenti lasciati a temperatura ambiente o mantenuti tiepidi ma non caldi, per diverse ore (32).

Al contrario di altre malattie, le tossinfezioni alimentari possono colpire chiunque. Ognuno può avere un'intossicazione alimentare e in modo relativamente facile. Fattori come lo stress giocano un ruolo importante nella resistenza di un individuo alle malattie di origine alimentare. Alcuni gruppi di persone sono naturalmente meno resistenti alle tossinfezioni alimentari a causa di un sistema immunitario più debole, questi sono (33):

- Gli anziani
- Le persone malate
- I neonati e i bambini piccoli

- Donne in gravidanza

2.1 Tossinfezioni alimentari

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), nel 1998, le tossinfezioni alimentari e le malattie veicolate da alimenti, hanno causato nel mondo circa 2,2 milioni di casi e 1,8 milioni di bambini deceduti a causa di malattie diarroiche. In Italia, le malattie a trasmissione alimentare vengono segnalate nel Sistema di Notifica Obbligatoria delle Malattie Infettive, coordinato a livello nazionale dal Ministero della Salute. Si tratta di un sistema di sorveglianza universale, che è in vigore dal 1934 e che è stato progressivamente modificato e aggiornato. Ad oggi, la sorveglianza dei focolai di tossinfezione alimentare avviene secondo il DM del 15 dicembre del 1990, il quale prevede la suddivisione delle malattie infettive in 5 classi secondo la gravità e la possibilità di un intervento o la necessità di raccogliere informazioni particolari (34). Le classi di interesse per quanto riguarda le malattie a trasmissione alimentare sono la **Classe I** che raccoglie notifiche di patologie poco frequenti ma severe per le quali è richiesta un'immediata segnalazione, spesso anche a livello internazionale (quale il colera), la **Classe II** che prevede la rilevazione di malattie ad elevata frequenza e passibili

interventi di controllo a lungo periodo. Nelle notifiche di **Classe III** sono comprese la diarrea infettiva o altre malattie che riguardano l'apparato digerente e patologie trasmesse attraverso gli alimenti (salmonellosi, epatite A, brucellosi, tularemia e listeriosi). Inoltre, patologie a trasmissione alimentare possono essere segnalate anche nella classe **IV** dedicata alla notifica di focolai epidemici e nella **V** che include tutte le altre malattie infettive non incluse nelle classi precedenti. Esaminando le notifiche di focolai di tossinfezione alimentare (**Classe IV**), nel 2005 in Italia si osserva che il numero di segnalazioni ammonta a circa 230. L'Emilia Romagna risulta essere la regione che segnala il maggior numero di episodi (20% del totale nazionale), seguita da Piemonte (15%), Provincia Autonoma di Bolzano (14%), Lazio (10%) e da tutte le altre regioni (34).

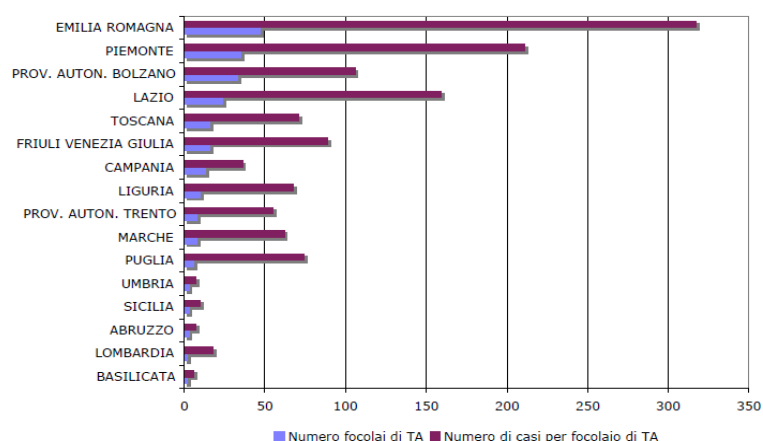


Figura 6. Numero assoluto di episodi epidemici in relazione al numero di casi per regione, 2005.

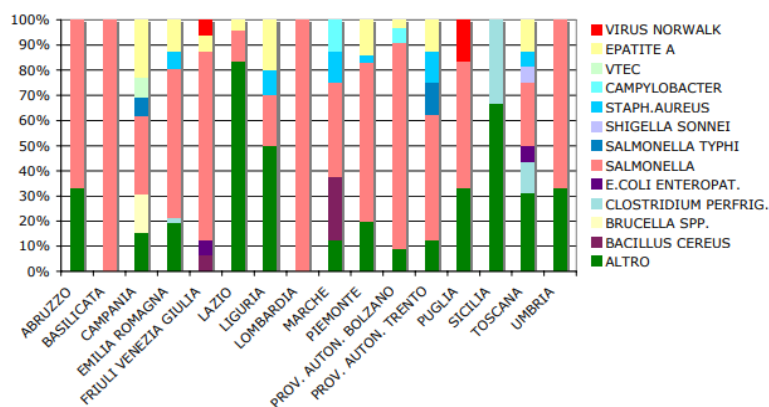


Figura 7. Distribuzione in percentuale dei microrganismi responsabili di episodi epidemici per regione (2005).

Secondo quanto riportato dal grafico in Figura 7, si può notare che il *Bacillus cereus* è presente in maggior quantità nella regione Marche, con un indice vicino al 20%, mentre presenta la percentuale minore in Friuli Venezia Giulia (circa 5%) ed è completamente assente in tutte le altre regioni elencate.

2.2 Focolai di tossinfezione

Nel 2010 è stato portato avanti un progetto di ricerca presso Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Lazio e Valle D’Aosta, riguardante “Indagine di un focolaio di malattia trasmessa da alimento” (35). I dati della ricerca ed i risultati sono riportati di seguito.

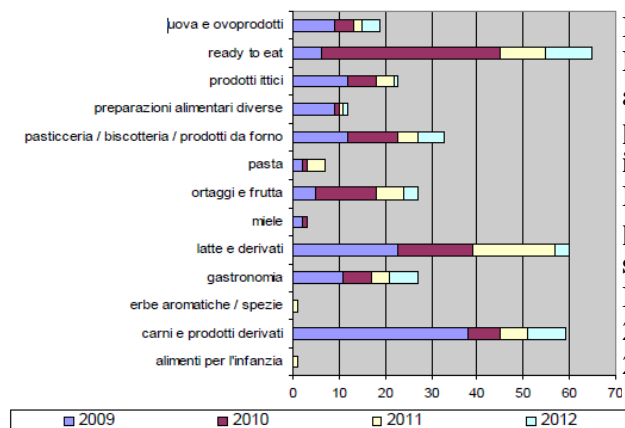


Figura 8.
Dettaglio
alimenti
pervenuti
in IZS
Piemonte
per
sospetto
MTA dal
2009 al
2012.

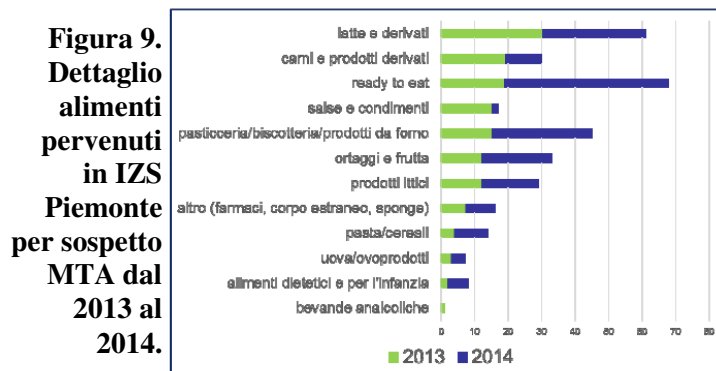


Figura 9.
Dettaglio
alimenti
pervenuti
in IZS
Piemonte
per sospetto
MTA dal
2013 al
2014.

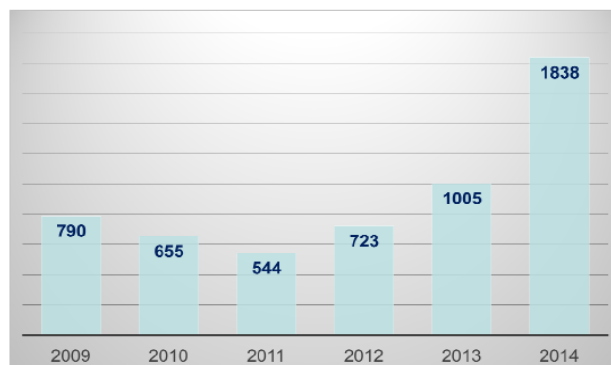


Figura 10.
Totale
analisi
eseguite
in IZS
Piemonte
per
sospetto
MTA.

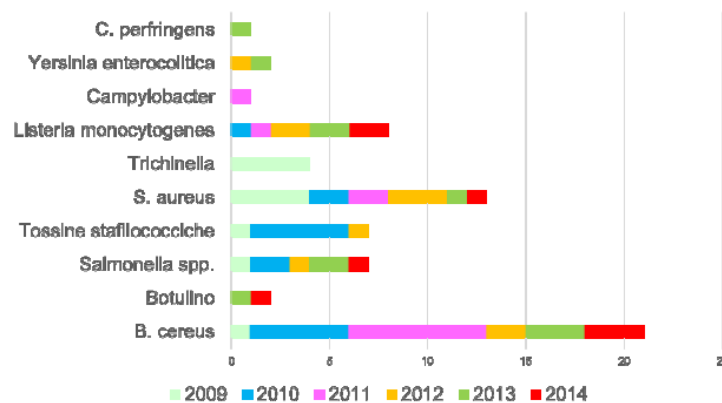


Figura 11. Campioni positivi alla ricerca dei patogeni in IZS Piemonte per sospetto MTA.

Da questa indagine si può notare che, in specifici alimenti, il batterio presente in quantità maggiori rispetto agli altri, è proprio il *Bacillus cereus*. Questo perché è un batterio che può trovarsi in moltissimi alimenti, ma soprattutto ha un range di crescita (temperature e pH) molto ampio.

2.3 Sistema rapido di allerta per alimenti e mangimi (RASFF)

Il sistema di allerta rapido europeo per alimenti e mangimi (RASFF) è stato istituito sotto forma di rete per notificare i rischi diretti o indiretti per la salute pubblica connessi agli alimenti e ai mangimi secondo il Regolamento (CE) 178/2002 (36), materiali ed oggetti destinati a venire a contatto con prodotti alimentari (MOCA), previsti dal Regolamento (CE) 1935/2004 (37), nonché per notificare i rischi diretti

ed indiretti per la salute degli animali e dell'ambiente previsti dal Regolamento (CE) 1831/2003 (38).

Per quanto riguarda le notifiche effettuate attraverso il sistema di allerta rapido europeo (RASFF), l'Italia risulta il terzo Paese membro del RASFF per numero di segnalazioni inviate alla Commissione europea nell'anno 2018 con un totale di 398 notifiche (Figura 12).

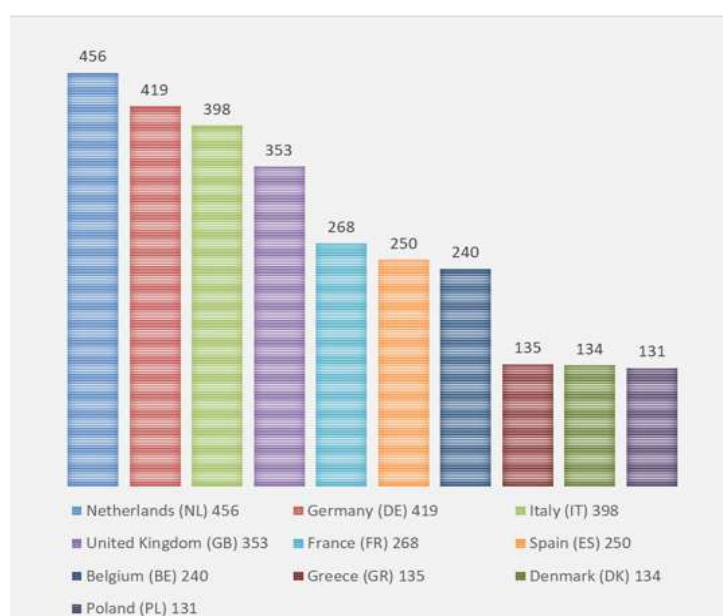


Figura 12. Numero di notifiche effettuate dai Paesi membri RASFF nell'anno 2018.

Nell'anno 2018 complessivamente sono state trasmesse complessivamente, attraverso il RASFF, 3622 notifiche, a fronte di 3759 del 2017.

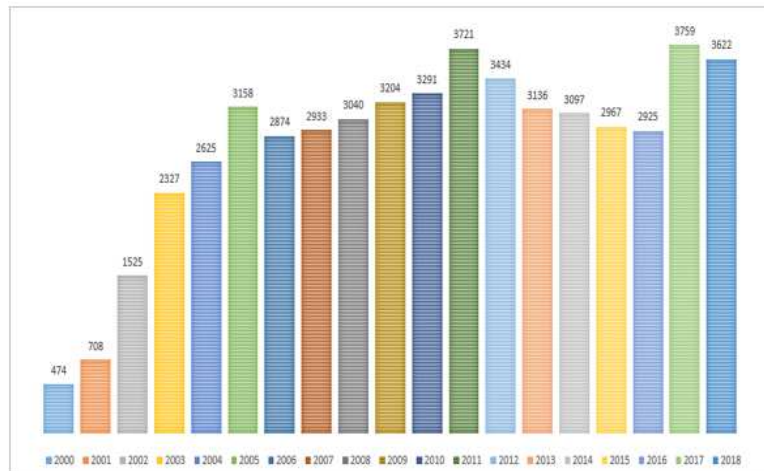


Figura 13. Numero di notifiche trasmesse al RASFF dal 2000 al 2018.

Come si evidenzia dall'istogramma in Figura 13, dal 2000 al 2017 le notifiche trasmesse al RASFF, hanno raggiunto numeri sempre più elevati, raggiungendo picchi nel 2005 con 3158 casi segnalati, nel 2011 con 3721 notifiche e nel 2017, le notifiche sono aumentate a 3759, registrando il numero più elevato degli ultimi anni. Nel 2018 invece, vi è un lieve decremento delle notifiche trasmesse al RASFF rispetto al 2017, con un numero pari a 3622 (Figura 12) (39).

Tale diminuzione potrebbe essere associata ad un'attenta applicazione dei principi riguardanti la sicurezza alimentare, adottata in ogni fase della filiera alimentare da parte dell'OSA, ma anche grazie alla puntualità dei controlli effettuati da parte degli organi competenti.

2.4 Ruolo dell'EFSA

Per proteggere i consumatori l'UE ha adottato un approccio che garantisce la sicurezza alimentare, dall'azienda agricola alla tavola, che consiste in misure di valutazione dei rischi (raccolta di dati, analisi, raccomandazioni) e di gestione dei rischi (misure legislative, obiettivi di riduzione). L'approccio è affiancato da efficaci e tempestive attività di comunicazione del rischio. L'EFSA (European Food Safety Authority) collabora con il Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (ECDC) e gli Stati membri dell'UE, per fornire consulenza scientifica sulle malattie zoonotiche di origine alimentare ai gestori, a livello nazionale ed europeo.

Le diverse attività che l'EFSA svolge per le zoonosi comprendono:

✓ Monitoraggio annuale

I casi di zoonosi di origine alimentare nell'UE sono monitorati e analizzati ogni anno dall'EFSA e dal Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (ECDC), allo scopo di fornire alla Commissione e agli Stati membri informazioni aggiornate sulla situazione corrente.

✓ **Raccolta di dati**

Gli Stati membri dell'UE raccolgono dati confrontabili sulla prevalenza di microrganismi negli alimenti o nelle popolazioni animali e trasmettono questi dati all'EFSA, perché li sottoponga ad analisi.

✓ **Analisi dei fattori di rischio**

L'EFSA e i suoi gruppi di esperti scientifici (gruppo BIOHAZ), individuano i fattori di rischio che contribuiscono alla crescita di microrganismi zoonotici nelle popolazioni animali, sulla base dei dati trasmessi dagli Stati membri e di altre informazioni pertinenti.

✓ **Valutazione del rischio**

I gruppi di esperti scientifici (BIOHAZ) dell'EFSA, svolgono la valutazione dei rischi per la salute pubblica sugli animali infetti e forniscono consulenza sull'impatto prodotto sui batteri, dalle nuove misure di controllo e di riduzione dei rischi.

✓ **Raccomandazioni e consulenza sulle misure di riduzione dei rischi**

I dati raccolti dagli Stati membri dell'UE fungono da base per la definizione di obiettivi per la riduzione di tali microrganismi negli animali. Grazie alle sue attività di consulenza scientifica, l'EFSA aiuta gli operatori del settore alimentare a individuare in anticipo gli effetti che le varie misure di controllo

produrranno sulla salute pubblica. L'impatto dei programmi di riduzione del rischio sull'attuale prevalenza delle zoonosi negli animali e negli alimenti, nonché sui casi di infezione nell'uomo a queste correlati, viene successivamente monitorato e analizzato nelle relazioni annuali dell'Unione europea (34).

Capitolo 3

3. PREVENZIONE

La norma cardine della sicurezza alimentare è individuata nel Regolamento (CE) N. 178 /2002 (36), il quale stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l’Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) e fissa delle procedure nel campo della sicurezza alimentare. Definisce inoltre, i criteri relativi l’igiene dei prodotti alimentari, misure e condizioni necessarie per controllare i rischi, in modo da garantire l’idoneità dei prodotti alimentari destinati al consumo umano. Il controllo igienico-sanitario degli alimenti, successivo all’entrata in vigore del Pacchetto Igiene (1 gennaio 2006), ha assunto connotati completamente diversi rispetto alla realtà esistente fino alla metà degli anni novanta. I controlli infatti, non sono più concentrati sul prodotto finale, ma devono essere distribuiti lungo tutto il processo di produzione.

3.1 Procedure HACCP

In questo nuovo scenario normativo, l’OSA diviene il principale responsabile dei propri prodotti e garante della salute dei consumatori ed è tenuto a predisporre, attuare e mantenere procedure basate sui principi del

sistema HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points), attraverso un'analisi dei rischi legati alla produzione dell'alimento e dei pericoli per il consumatore, come previsto dall'art. 5 del Regolamento (CE) n. 853/2004.

I principi su cui si basa il sistema HACCP sono sette:

1. **identificare ogni pericolo** che deve essere prevenuto, eliminato o ridotto a livelli accettabili;
2. **identificare i punti critici di controllo** nella fase o nelle fasi in cui il controllo stesso si rivela essenziale per prevenire, eliminare un rischio o per ridurlo a livelli accettabili;
3. **stabilire**, nei punti critici di controllo, **i limiti critici** che differenziano l'accettabilità e l'inaccettabilità ai fini della prevenzione, eliminazione o riduzione dei rischi identificati;
4. stabilire ed applicare **procedure di sorveglianza** efficaci **nei punti critici di controllo**;
5. **stabilire le azioni correttive** da intraprendere nel caso in cui dalla sorveglianza risulti che un determinato punto critico non è sotto controllo;
6. **stabilire le procedure** da applicare regolarmente, per verificare **l'effettivo funzionamento delle misure** (previste nei punti da 1 a 5);
7. **predisporre documenti e registrazioni** adeguati alla natura e alle dimensioni dell'impresa alimentare

al fine di dimostrare l'effettiva applicazione delle misure (previste nei punti da 1 a 6).

Al fine di identificare se una fase all'interno del processo produttivo di un alimento è da ritenersi un punto critico di controllo (CCP) o solamente un punto critico (CP), come strumento decisionale, viene utilizzato l'"Albero delle decisioni". Una fase rappresenta ogni stadio di produzione e/o manipolazione degli alimenti. Inoltre, dato che ogni processo produttivo può presentare dei CCP o CP, risulta fondamentale la predisposizione di un diagramma di flusso, cioè una rappresentazione schematica del processo produttivo del prodotto finito, quanto più possibile dettagliata e completa, che fornisca le basi per l'individuazione di questi punti.

3.2 Metodi di prevenzione e controllo

Sebbene non si presti normalmente attenzione al riso come veicolo di patologie, esiste la possibilità, di incorrere in un'intossicazione da *Bacillus cereus*, le cui spore sono ubiquitarie e contaminano frequentemente il riso. Risulta molto importante quindi considerare e tenere sotto controllo tutti i fattori che possono portare alla crescita del batterio.

3.2.1 Controllo delle temperature

Le spore sono in grado di sopravvivere a temperature altissime o vicine allo zero assoluto. Proprio per

questo sono in grado di resistere al processo di cottura del riso. Inoltre il riso cotto, se lasciato raffreddare a temperatura ambiente, rappresenta un terreno di coltura ottimale, per cui le spore iniziano a colonizzare il substrato, raggiungendo numeri abbastanza alti da causare malattia. Nel riso le spore vengono inattivate dopo 2-7 minuti a 100°C. Anche la refrigerazione a temperature non superiori a 4°C, limita la moltiplicazione di *Bacillus cereus*, allungando i tempi di germinazione delle spore e generazione di tossine. Per prevenire le tossinfezioni alimentari da *Bacillus cereus*, quindi è importante non conservare i cibi a temperatura ambiente e soprattutto conservare i cibi pronti, specie se ricchi di amido, a temperatura non inferiore a 60°C o non superiore a 4°C.

3.2.2 Controllo del pH

Il *Bacillus cereus* non è un organismo particolarmente acido resistente. Infatti diversi esperimenti hanno mostrato che l'acidificazione del riso tramite acido acetico, è in grado di inibire la forma vegetativa, portando il pH a circa 4,2. Una corretta acidificazione, procedimento alla base della preparazione del riso per sushi, è quindi sufficiente a ridurre la carica batterica e la pericolosità delle spore

di *Bacillus cereus* sopravvissute alla cottura, tenendo il valore del pH al di sotto del limite.

3.2.3 Corretta prassi igienica

La contaminazione degli alimenti può avvenire durante tutte le fasi operative. Risulta infatti efficace per prevenire gli episodi di malattia, il rispetto delle norme igieniche nelle diverse fasi di preparazione, trasformazione e distribuzione degli alimenti. Tanto che l'OMS stabilisce delle regole per prevenire la diffusione di tossinfezioni alimentari, come scegliere cibo preparato in modo sicuro, cuocere completamente e consumare immediatamente i cibi cotti, conservare attentamente i cibi potenzialmente contaminati, riscaldare completamente i cibi già cotti, evitare il contatto fra cibi cotti e cibi crudi, lavarsi ripetutamente le mani, mantenere le superfici della cucina meticolosamente pulite, proteggere i cibi da insetti, roditori e altri animali e usare acqua pura.

3.3 Formazione del personale

La formazione del personale è uno strumento essenziale per assicurare l'efficace applicazione delle buone pratiche igieniche. Il Regolamento (CE) 852/2004, allegato II, capitolo XII, prevede che gli operatori del settore alimentare devono assicurare:

1. che gli addetti alla manipolazione degli alimenti abbiano ricevuto un addestramento e/o una

formazione, in materia d'igiene alimentare in relazione al tipo di attività;

2. che i responsabili dell'elaborazione e della gestione della procedura di cui all'articolo 5, abbiano ricevuto un'adeguata formazione per l'applicazione dei principi del sistema HACCP.

3.4 Sterilizzazione

La bonifica degli alimenti è una pratica che ha come obiettivo l'eliminazione dei microrganismi in grado di provocare danni ai prodotti alimentari e causare malattie ai consumatori. Questa procedura può avvalersi di due metodi, *fisici* (Pastorizzazione, Cottura, Sterilizzazione, Radiazioni ionizzanti) o *chimici* [Alcol o Additivi (Antimicrobici)].

Tipi di sterilizzazione	T °C	tempi	Alimenti
Appertizzazione	100-120 °C	20 minuti	Alimenti inscatolati ermeticamente
Sterilizzazione in autoclave	121 °C (1 atmosfera)	20 minuti	Conservas vegetali
UHT	140-150 °C	pochi secondi	Alimenti sfusi (latte) Seguita da confezionamento in linea in contenitori sterili

Figura 14. Tipologie di sterilizzazione. Temperature, tempi e tipologie di alimenti che vengono generalmente sottoposti alla sterilizzazione.

La sterilizzazione in particolare, è in grado di distruggere tutti i microrganismi, comprese le spore. Dal punto di vista nutrizionale, la sterilizzazione non

è molto vantaggiosa, in quanto l'alta temperatura inattiva le vitamine e fa denaturare le proteine (40).

SECONDA PARTE

Capitolo 4

4. SCOPO DELLA TESI

La nuova tendenza relativa al consumo di sushi, registra numeri sempre più elevati, soprattutto grazie al boom del servizio take-away, che dà la possibilità di poter ordinare e mangiare queste pietanze comodamente a casa. Al contempo però, ha progressivamente preso piede nella maggior parte del mondo e anche in Italia, un aumento dei casi di tossinfezione alimentare legati a questi alimenti. Diviene quindi necessario attuare metodi di prevenzione e analisi mirate a valutare la salubrità degli alimenti e la corretta applicazione delle buone prassi operative, previste dalla legislazione alimentare.

Lo scopo della presente tesi è quello di valutare il rischio di sviluppo di *Bacillus cereus* nel riso destinato alla preparazione di sushi in alcune attività di ristorazione presso i quali è stata effettuata un'attività di campionamento volta alla ricerca del *Bacillus cereus* presunto all'interno del riso e la misurazione dei parametri che possono influire nella

crescita microbica, rappresentati dal pH e dall'attività dell'acqua (a_w).

Capitolo 5

5. MATERIALI E METODI

La raccolta dei dati necessari all'espletamento di questa tesi sono stati acquisiti presso gli esercizi di somministrazione di sushi, localizzati tutti nella regione Marche e in particolare nella Provincia di Macerata (MC). I campionamenti effettuati sono stati eseguiti precisamente presso tre Ristoranti e uno Chalet, i quali propongono il tipico piatto della cucina giapponese. Prima di effettuare il campionamento, venivano somministrati agli OSA alcuni quesiti, in modo da ottenere informazioni utili su tempistiche di preparazione e conservazione dei prodotti, allo scopo di capire meglio i risultati analitici dei campioni. Durante il sopralluogo inoltre, sono state chieste le modalità di preparazione del riso e della salsa di aceto, le proporzioni utilizzate per queste ricette, le modalità di raffreddamento, il periodo di conservazione, considerando anche agli orari di apertura e chiusura della struttura.

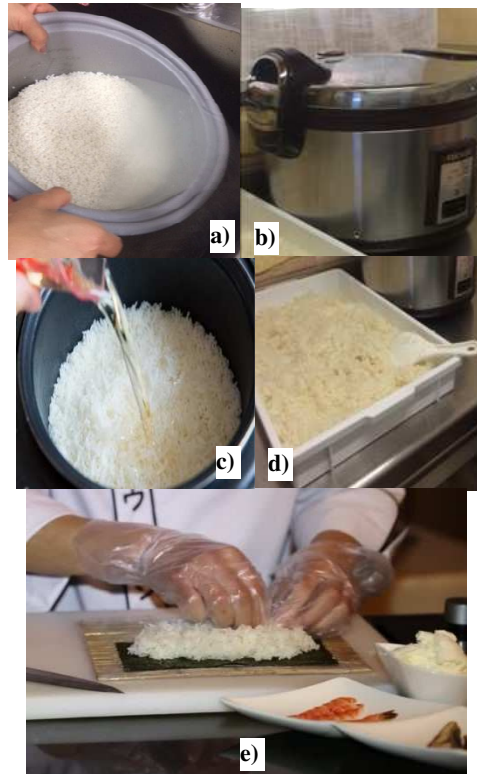
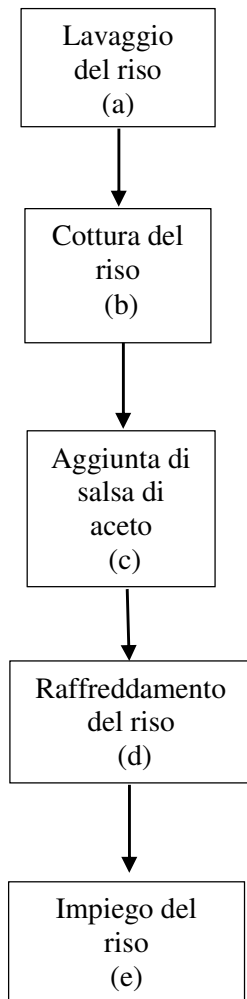
5.1 Preparazioni ingredienti

Tutte le strutture utilizzano analoghe metodiche di preparazione, con lievi variazioni, sia per quanto

riguarda il riso, ma anche per la salsa di aceto che viene aggiunta dopo la cottura.

5.1.1 Riso

Nelle strutture analizzate, vengono preparati generalmente 3 Kg di riso al giorno, il quale viene lavato e poi fatto cuocere in un'apposita pentola a vapore, simile in tutte le strutture, con 1 litro di acqua, per circa 1 ora.



5.1.2 Salsa di aceto

La salsa è costituita da più ingredienti, uguali in tutte le strutture: aceto di riso, zucchero e sale. Questa può presentare delle variazioni di dosaggio dei vari ingredienti e quindi può differire da una struttura alimentare ad un'altra (Tabella 1).

Tabella 1. Ingredienti della salsa di aceto e relative proporzioni dichiarate dai sushisti.

	Struttura 1 (Porto Recanati)	Struttura 2 (Macerata)	Struttura 3 (Sforzacosta)	Struttura 4 (Tolentino)
<i>Salsa di aceto</i>	10 L	18 L	14 L	900 ml
Aceto di riso	10 L	18 L	14 L	900 ml
Zucchero	10 Kg	10 Kg	7 Kg	550 g
Sale	1 Kg	1 Kg	2 Kg	150 g
<u>Proporzioni</u>	1 Kg di riso = 300 ml di salsa	1 Kg di riso = 300 ml di salsa	1 Kg di riso = 400 ml di salsa	1 Kg di riso = 300 ml di salsa

5.2 Campionamento

Il campionamento di alimenti per determinazioni microbiologiche, chimiche o fisiche, rappresenta un aspetto importante dell'attività espletata dagli operatori che eseguono il Controllo Ufficiale, previsto dal Regolamento (CE) 882/2004 (41). Anche da parte dell'OSA, il controllo degli alimenti preparati, è considerata una metodologia operativa necessaria, che consente loro di poter tenere sotto controllo i parametri dei singoli alimenti. Il Campione, definito dal Regolamento (CE) 2073/2005, è suddiviso a sua volta in Aliquote, frazione rappresentativa del campione, ciascuna delle parti in cui deve essere suddiviso il campione e da Unità Campionarie (u.c.), che rappresentano le unità elementari del campione.

Per effettuare il campionamento di riso, sono stati indossati retina per capelli, camice bianco,

guanti in lattice sterili e sono stati utilizzati sacchetti sterili per alimenti ed un cucchiaino sterilizzato mediante flambatore per prelevare il riso. Durante il campionamento è stato prelevato un campione costituito da aliquota unica, contenente 100 g di riso, come previsto dalla normativa per gli alimenti prossimi alla scadenza, cioè con vita commerciale inferiore ai cinque giorni, come nel caso del riso che viene utilizzato per massimo due giorni.

Le modalità di prelevamento, conservazione e trasporto dei campioni di alimenti di origine animale e non animale, sono normate dai Regolamenti contenuti nel Pacchetto Igiene. I campioni effettuati sono stati trasportati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche con sede a Tolentino (MC), a temperatura ambiente, come previsto dalle metodiche di raffreddamento e conservazione messe in atto dalle strutture

stesse. Per ogni campione numerato inoltre, è stato compilato un “Modulo Accettazione Campioni”, ovvero un modello necessario all’identificazione del campione, previsto dall’Istituto per l’accettazione.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE N° ACCETTAZIONE

MODULO ACCETTAZIONE CAMPIONI

DATI DELL'UTENTE (FATTURAZIONE) PRIVATO CONVENZIONATO PUBBLICO

RAGIONE SOCIALE / COGNOME E NOME: _____

Codice Fiscale Parita Iva

Via _____ Località _____

Comune _____ Prov. _____ C.A.P. _____ Telefono _____

DATI DEL PROPRIETARIO/ATTIVITA' Cod. Allevamento _____

RAGIONE SOCIALE/COGNOME E NOME: _____

Via _____ Località _____

Comune _____ Prov. _____ C.A.P. _____

DATI DEL RICHIEDENTE Telefono _____

RAGIONE SOCIALE/COGNOME E NOME: _____

Via _____ Località _____

Comune _____ Prov. _____ C.A.P. _____

Data prelievo:.....

Temperatura ora di consegna: Operatore

Parere di accettabilità : favorevole sfavorevole

Firma cliente.....

Figura 15. Particolare del Modulo accettazione campioni. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Umbria e delle Marche (<http://www.izsum.it/IZSUM/>).

Capitolo 6

6. RISULTATI

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale con sede a Tolentino (MC), presso il quale sono stati valutati i parametri chimici e microbiologici dei campioni di riso prelevati, ha garantito una certa rapidità nell'analisi e comunicazione dei risultati, affermando la qualità e la salubrità del riso campionato.

Di seguito si riportano i risultati ottenuti dall'analisi dei campioni effettuati presso le strutture prese in esame, indicando per ogni singola struttura, i valori di ciascun parametro rilevati, rappresentati dal pH, Attività dell'acqua (*aw*) e *Bacillus cereus* presunto.

Tabella 2. Risultati analisi effettuate dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche di Tolentino sui campioni di riso.

	<i>Data di produzione</i>	Attività dell'acqua (aw)	pH	<i>Bacillus cereus</i> presunto
Struttura 1 (1 solo campione)				
<i>Prodotto</i>	20/9/2019			
<i>Campionato</i>	21/9/2019			
RISULTATO		0,991	4,51	<10 UFC/g
Struttura 2 (2 campioni)				
<i>Prodotto</i>	20/9/2019			
<i>Campionato</i>	21/9/2019			
RISULTATO 1		0,991	4,47	<10 UFC/g
<i>Prodotto</i>	21/9/2019			
<i>Campionato</i>	21/9/2019			
RISULTATO 2		0,987	4,19	<10 UFC/g
Struttura 3 (1 solo campione)				
<i>Prodotto</i>	21/9/2019			
<i>Campionato</i>	21/9/2019			
RISULTATO		0,992	4,51	<10 UFC/g
Struttura 4 (1 solo campione)				
<i>Prodotto</i>	23/9/2019			
<i>Campionato</i>	24/9/2019			
RISULTATO		0,959	4,12	<10 UFC/g

I risultati ottenuti dai campioni analizzati sono leggermente diversi tra loro, in virtù di diverse metodiche di preparazione e dosaggio degli ingredienti. I campionamenti specifici per questa tipologia di pietanza, sono stati effettuati allo scopo di constatare i valori dei singoli fattori che influenzano la crescita microbica, come il pH e attività dell'acqua (a_w), ma anche per determinare l'eventuale presenza del *Bacillus cereus*, così da verificare la puntuale applicazione da parte di queste strutture, delle corrette prassi operative previste dalla normativa vigente, così come riportate nel Manuale di Autocontrollo HACCP.

DISCUSSIONE

Questa tipologia di ricerca ha dimostrato che le tecniche di preparazione degli alimenti, attuate dalle strutture analizzate, sono idonee per prevenire l'insorgenza di microrganismi che possono causare Tossinfezioni Alimentari nell'uomo. Infatti dai risultati riportati in precedenza (Tabella 2), si può notare che tutti i campioni presentano valori più bassi rispetto a quelli che possono provocare la crescita microbica, tranne che per l'acqua libera che presenta valori leggermente superiori al limite.

Considerazioni

I risultati ottenuti non stupiscono molto, in quanto è stato appurato durante i sopralluoghi, che le strutture analizzate conservano il riso a temperatura ambiente, per un giorno o al massimo due. Queste tempistiche di conservazione unitamente al pH del prodotto, garantiscono da parte degli OSA un livello di prevenzione e protezione per i consumatori molto alto.

Nella Struttura 2 sono stati effettuati due campionamenti, uno relativo al riso preparato il giorno prima del prelievo e uno al giorno stesso. I risultati del pH sono leggermente diversi e ciò

potrebbe essere imputabile sia ad una mancata standardizzazione sia ad un aumento del valore di pH con il passare del tempo dal momento della preparazione.

Prendiamo inoltre in considerazione due delle strutture analizzate, in particolare la Struttura 1 e la Struttura 2 citata prima. Entrambi hanno lo stesso gestore, il quale dichiara di usare le medesime tecniche di preparazione della salsa e del riso con gli stessi dosaggi. Questa considerazione viene fatta alla luce dei risultati ottenuti dell'analisi dei campioni, i quali mostrano risultati del pH diversi per le due strutture (Struttura 1 e Struttura 2 - risultato 1, entrambi conservati dal giorno prima). Questa anomalia, come nel caso precedente, potrebbe essere ricondotta ad una mancanza di standardizzazione delle metodiche di lavorazione, che se applicate correttamente consentono il miglioramento progressivo delle abitudini e quindi un'ottimizzazione delle pratiche di produzione e genuinità del prodotto finito. La standardizzazione è alla base del sistema HACCP, in quanto garantisce unanimità della produzione nel tempo, tenendo sotto controllo i CP e i CCP.

Allo stesso tempo nella Struttura 4, il valore del pH è risultato più basso di tutti gli altri (riso preparato il

giorno prima del campionamento come per gli altri). Ciò potrebbe essere legato alla periodicità della preparazione della salsa di aceto che viene unita al riso, la quale permette di abbassare il pH (acidificazione). Infatti in questa struttura la salsa viene preparata più volte alla settimana, in quantità ridotte, al contrario delle altre strutture che la preparano una volta a settimana, le quali presentano dei risultati che sono appena al di sotto del valore minimo di 4,6.

Risulta quindi plausibile affermare che una metodologia operativa più scrupolosa può garantire maggiore sicurezza degli alimenti.

Perciò è importante elaborare in partenza un piano di autocontrollo HACCP, in cui vengono indicate le varie fasi critiche ed eventuali CP o CCP, presenti nel processo produttivo, definendo e garantendo così una standardizzazione continua.

Inoltre in tutte le strutture l'acqua libera (aw) presenta un valore superiore a 0,95, ma allo stesso tempo è stato dimostrato tramite i campionamenti che tali valori di acqua libera non compromettono la salubrità del prodotto, dato che non è stata rilevata crescita microbica nel riso.

Ciò dimostra che il riso è un alimento particolarmente critico da trattare, in quanto prevede accorgimenti

specifici e soprattutto non può essere conservato per molti giorni, soprattutto a temperatura ambiente.

Confronto

Nel caso dei campioni raccolti, analizzati e descritti all'interno di questo elaborato, è stato appurato che i risultati ottenuti garantiscono un alto livello di qualità delle matrici alimentari considerate e che quindi non compromettono la salute dell'uomo. Al contrario però negli anni passati ci sono stati anche dei casi di intossicazione da *Bacillus cereus*, riportati dal Journal of Clinical Microbiology (<https://jcm.asm.org>). Questi casi sono per lo più legati ad un altro fattore che porta alla crescita del *Bacillus cereus*, ovvero la temperatura, che dovrebbe essere sempre tenuta sotto controllo, specialmente se la pietanze vengono conservate per un lungo periodo. Nel 2003, una famiglia costituita da 5 bambini ha riportato una grave intossicazione alimentare dopo aver mangiato un'insalata di riso preparata 8 giorni prima. Tutti e 5 i bambini hanno avuto bisogno di assistenza medica e cure intensive, mentre la più piccola, di soli 7 anni, è morta per insufficienza epatica. L'insalata di riso veniva preparata il venerdì e portata a un picnic il sabato successivo. La parte avanzata era stata conservata in frigorifero fino al lunedì seguente, servita poi per cena ai bambini.

Poiché l'insalata di riso aveva un odore insolito, tre bambini (B14, G10 e G9) ne mangiavano solo una piccola quantità. A 6 ore dopo il pasto la bambina più piccola (G7) di 7 anni, ha iniziato a vomitare. Si lamentava delle difficoltà respiratorie e fu portata al pronto soccorso. All'arrivo, anche i suoi fratelli e sorelle hanno iniziato a vomitare. Poiché le condizioni cliniche di due bambini (G7 e B9) si sono deteriorate rapidamente, sono stati intubati e ventilati meccanicamente. Durante il trasporto all'ospedale, G7 presentava una grave emorragia polmonare e necessitava di una rianimazione continua. All'arrivo in ospedale era entrata in coma, con sanguinamento diffuso e crampi muscolari gravi. È morta entro 20 minuti, a 13 ore dopo il pasto. L'autopsia ha rilevato la presenza di *Bacillus cereus* all'interno dell'intestino ma anche nella milza, probabilmente per traslocazione post-mortem del batterio. Anche se nell'insalata di riso, la presenza di *Bacillus cereus* non è stata dimostrata direttamente, la sua produzione ad alto livello è stata indirettamente provata nel test di citotossicità degli isolati.

Il presente caso illustra la possibile gravità della sindrome emetica e l'importanza di un'adeguata refrigerazione del cibo preparato. Poiché la tossina emetica è preformata nel cibo e non inattivata dal

trattamento termico, è importante prevenire la crescita e la produzione di cereulide (piccolo peptide ciclico, che agisce formando un poro e portando ad insufficienza epatica).

Alcuni ceppi di *Bacillus cereus* sono noti per essere psicrotrofi, cioè in grado di crescere a temperature inferiori o uguali a 5°C e avere la più alta produzione di tossine emetiche tra 12 e 15°C. In questo caso, la temperatura del frigorifero in cui veniva conservata l'insalata di pasta era di 14°C. Ciò ha permesso a *Bacillus cereus* di crescere fino a un numero di oltre 10⁸ UFC/g in 3 giorni, con una produzione di tossina probabilmente molto elevata che potrebbe spiegare il risultato fatale (42).

Le prove epidemiologiche rilevate nel tempo in tutto il mondo, suggeriscono che la maggior parte dei focolai dovuti a *Bacillus cereus*, sono stati associati a concentrazioni superiori a 10⁵ UFC/g negli alimenti. Sono stati riportati inoltre, casi rari di malattia sia emetica che diarroica correlati a concentrazioni 10³-10⁵ UFC/g di *Bacillus cereus* nel cibo, in neonati o individui anziani e in soggetti più sensibili (43) (44). Nonostante i risultati dei campioni di riso effettuati siano inferiori ai limiti stabiliti (Tabella 2), il caso riportato in precedenza, fa capire che il pericolo rappresentato dal *Bacillus cereus* non è da

sottovalutare, in quanto è in grado di causare nell'uomo conseguenze molto gravi come la morte.

Linee guida relative al piano HACCP per il riso del sushi

Come descritto nella Parte Prima di questa tesi, il sushi è un tipico piatto della cucina Giapponese che consiste in riso acidificato, combinato con vari ripieni e condimenti, come pesce crudo o altri ingredienti. In questi ristoranti il riso è generalmente conservato a temperatura ambiente.

Uno dei principali patogeni associati alla cottura del riso è il *Bacillus cereus*, il quale forma spore che possono sopravvivere alla normale cottura. Se il riso cotto viene conservato fuori le temperature controllate, le spore rilasciate dal batterio possono germinare e produrre tossine che, se consumato, possono causare malattie nell'uomo. Una delle misure di controllo per garantire la salubrità del riso cotto e conservato a temperatura ambiente, è l'utilizzo di una soluzione di aceto che riduce il pH al di sotto di 4,6 (valore minimo di pH secondo il CalCode), inibendo la crescita di batteri nocivi.

Garantire però, una sicurezza costante per quanto riguarda il riso per sushi, è sempre più difficile. Questo perché, come si può notare dai risultati ottenuti dai campioni analizzati (Tabella 2), ciascun

cuoco che prepara sushi, usa la propria ricetta con differenti quantità di soluzione di aceto che può comportare diversi livelli di pH.

A tal proposito, le “Linee guida del piano HACCP relativo al riso per sushi”, previste dal California Retail Food Code (CalCode) (45), prevedono un piano per l’analisi dei punti critici di controllo, per tutte quelle strutture alimentari che utilizzano additivi o componenti alimentari come l’aceto, per rendere un alimento non potenzialmente pericoloso. Queste strutture per essere conformi a quanto stabilito dal CodiceCalo, devono mantenere il riso a temperatura controllata di refrigerazione (al di sotto di 4°C) o tenerlo a temperature elevate (a 57-58°C o superiore), e applicare monitoraggio continuo su tutti i fattori che possono portare la crescita microbica, come pH, acqua libera e temperatura.

L’acidificazione del riso è un aspetto molto importante nella preparazione del sushi, perché garantisce la salubrità del riso, utilizzato nella preparazione di alcune tipologie di pietanze. Pertanto il processo di acidificazione deve essere considerato un CCP, il quale impone dei controlli da parte dell’OSA, espletati attraverso il monitoraggio e tramite l’utilizzo di strip manuali e validazioni mediante analisi in laboratorio.

CONCLUSIONI

Il settore dei controlli degli alimenti ha subito un radicale cambiamento di impostazione dopo l'entrata in vigore del "Pacchetto Igiene". Da quel momento in poi, l'OSA deve garantire la salubrità del prodotto tenendo sotto controllo tutti i fattori di crescita dei microrganismi, attuando azioni di prevenzione. Purtroppo però, il rapido sviluppo di ristoranti di sushi e sushi-bar, spesso in associazione ad una scarsa formazione nell'ambito della sicurezza alimentare e nella più specifica gestione dei prodotti a base di pesce crudo e prodotti contenenti amido, hanno portato ad una mancata o non corretta applicazione di quelle procedure necessarie per rendere il rischio accettabile.

In conclusione, dato che i campioni provenienti dagli esercizi di ristorazione analizzati sono risultati soddisfacenti, questi danno garanzia di freschezza del prodotto e un livello di attenzione da parte dell'OSA molto alto.

Allo stesso modo, anche se i risultati ottenuti indicano nel complesso che le condizioni di lavoro e delle materie prime sono idonee, non si deve escludere un margine di miglioramento relativamente alle

condizioni igieniche durante le fasi di lavorazione, perseguibile dai responsabili di alcuni esercizi. In questo contesto, la prevenzione costituisce un requisito indispensabile del sistema produttivo, attuando strategie che coinvolgano tutti coloro che si occupano di produzione, trasformazione, distribuzione e somministrazione del cibo, ma soprattutto tenendo sotto controllo tutti i parametri che permettono la crescita dei microrganismi patogeni all'interno degli alimenti e causare tossinfezioni alimentari nell'uomo. Questi controlli vengono attuati "A monte" della catena produttiva e non "A valle" (prodotto finito), come previsto dalle normative precedenti all'entrata in vigore del Pacchetto Igiene.

Nel contesto della prevenzione rientra anche un requisito obbligatorio ed essenziale, ovvero la standardizzazione delle lavorazioni all'interno dei locali di produzione/trasformazione degli alimenti, attraverso la formazione del personale in merito alle procedure di corretta prassi igienica. Nei processi produttivi la standardizzazione può avere diversi vantaggi, come garantire un miglior utilizzo delle materie prime, la diminuzione degli sprechi, un minor danno economico, migliori tempi di gestione del personale impiegato, ma soprattutto un prodotto

finito di alta qualità, conforme alla normativa vigente in materia alimentare.

Quindi dato che il valore del pH nel riso non è standard, l'OSA nel Manuale di Autocontrollo HACCP, deve stabilire necessariamente un valore di pH da considerare accettabile (comunque sempre inferiore a 4,6) e che non deve essere superato.

BIBLIOGRAFIA

- (1) -FIPE (federazione italiana pubblici esercizi), Note per la stampa (gennaio 2019) “Ristorazione: rapporto annuale”
nuovi stili alimentari
<https://www.fipe.it/comunicazione/note-per-la-stampa/item/6166-ristorazione-rapporto-annuale.html>.
- (2) -Fondi&Sicavi (2018) Redazione Lifestyle “Sushi day, tra trend e numeri da capogiro”
<https://www.fondiesicav.it/sushi-day/>.
- (3) -Dott. G. Masotti Asl Roma/A (2009) Progetto sushi
“Verifica delle condizioni igieniche, operative e strutturali in ristoranti giapponesi che preparano e somministrano prodotti a base di pesce crudo”.
- (4) -NIHON JAPAN GIAPPONE, La terra del sol levante
“La storia del sushi in Giappone”
<http://www.nihonjapangiappone.com/pages/cucina/sushi/storia.php>.
- (5) -Cucina Giapponese 2.0 “SUSHI, UN PO’ DI STORIA”
<https://www.cucinagiapponese.net/cucina-giapponese/articolo-storia-sushi.html>.
- (6) -Rai 3 (2018) Sushiko, Articolo “Italiani ‘divoratori’ di sushi. Consumi su del 70%”
<http://www.rai.it/dl/tg3/articoli/ContentItem-f25a1453-2da8-4dd2-92a1-6254286ba86d.html>.
- (7) -Ansa (marzo 2019) “Un 'bollino' di qualità per i ristoranti giapponesi all'estero”
http://www.ansa.it/canale_terraegusto/notizie/in_breve/2019/03/03/un-bollino-di-qualita-per-ristoranti-giapponesi-allestero_6d1efaf8-5bc9-42df-a96a-a58bfd4bde9c.html.

- (8) -A. Sacchi, Notizie.it, Food blog, Dieta e Benessere
(marzo 2019) “RISTORANTE GIAPPONESE
CERTIFICATO, NASCE IL BOLLINO PER
RICONOSCERLI”
https://www.foodblog.it/ristorante-giapponese-certificato-nasce-il-bolino/?refresh_ce.
- (9) -Sushi Italia.com (2010) “Tipi di sushi”
<https://www.sushitalia.com/tipi-di-sushi.html>.
- (10) -Sushiko “Tipi di sushi: guida definitiva”
<https://www.sushiko.it/it/tipi-sushi/#chirashi>.
- (11) -Just Eat (giugno 2019) “I 10 Piatti di Sushi a Domicilio Preferiti dagli Italiani”
<https://www.justeat.it/blog/pizza-a-domicilio-ma-non-solo/sushi-a-domicilio-top10-italiana>.
- (12) -Dr.ssa S. Martino (2016) “Anisakidosi”
<http://www.veterinariaalimenti.marche.it/Articoli/category/normativa-generale/7647>.
- (13) -Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE) “Anisakis”
<https://www.izsvenezie.it/temi/malattie-patogeni/anisakis/>.
- (14) -Regolamento (CE) N. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, sull’igiene dei prodotti alimentari, G. U. dell’Unione europea L 139 del 30 aprile 2004.
- (15) -Regolamento (CE) n. 853/2004 Del Parlamento Europeo E Del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale (Gazzetta ufficiale dell’Unione europea L 139 del 30 aprile 2004).

- (16) -Gazzetta Ufficiale, DECRETO 17 luglio 2013
Informazioni obbligatorie a tutela del consumatore di pesce e cefalopodi freschi e di prodotti di acqua dolce, in attuazione dell'articolo 8, comma 4, del decreto-legge 13 settembre 2012 n. 158, convertito, con modificazioni, dalla legge 8 novembre 2012, n. 189 (GU Serie Generale n.187 del 10-08-2013).
- (17) -EFSA (2016) “Listeria”
<http://www.veterinariaalimenti.marche.it/Articoli/7628>.
- (18) -Dott. Stefano Gabrio Manciola (2017) Articolo
“Intossicazione da istamina”
<http://www.veterinariaalimenti.marche.it/Articoli/intossicazione-da-istamina>.
- (19) -EFSA, Articolo “Metalli come contaminanti negli alimenti”
<https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/metals-contaminants-food>.
- (20) -Istituto zooprofilattico sperimentale del Mezzogiorno (2009) “La contaminazione da metalli pesanti nei prodotti della pesca”, Da: Il Pesce nr. 3, 2007 nella rubrica “La pagina scientifica”, L. Severino- R. Russo Università degli Studi di Napoli Federico II
<http://www.orsacampania.it/la-contaminazione-da-metalli-pesanti-nei-prodotti-della-pesca/>.

- (21) -La Repubblica, archivio (1998) “Cereus, il germe del riso che si annida ovunque”
<https://ricerca.repubblica.it/repubblica/archivio/repubblica/1998/04/12/cereus-il-germe-del-riso-che-si.html>.
- (22) -Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, M. Aleandri (maggio 2019) C.S.A. Centro Sicurezza Alimentare “*Bacillus cereus*”
<http://www.izslt.it/bacillus-cereus/>.
- (23) Food Safety News (immagine)
<https://www.foodsafetynews.com/2018/12/australian-scientists-discover-how-to-fight-bacillus-cereus-bacteria/>.
- (24) -F. Villani, Università degli studi di Napoli Federico II, web learning “15. Batteri patogeni trasmessi con gli alimenti: *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* e *perfringens*”
<http://www.federica.unina.it/agraria/microbiologia-degli-alimenti/batteri-patogeni-trasmessi-con-gli-alimenti-bacillus-cereus-clostridium-botulinum-clostridium-perfringens/>.
- (25) -G. Poda, Regione Emilia – Romagna CDS Aziende USL Città di Bologna e Ravenna ARPA prevenzione nei luoghi di vita e di lavoro Dossier 30 “Metodi microbiologici per lo studio delle matrici alimentari”, a cura di: D. Bernardi “*Bacillus cereus*”.
- (26) -G. Poda, Regione Emilia – Romagna CDS Aziende USL Città di Bologna e Ravenna ARPA prevenzione nei luoghi di vita e di lavoro Dossier 30 “Metodi microbiologici per lo studio delle matrici alimentari”, a cura di: D. Bernardi “*Bacillus cereus*”.
- (27) -Food Safety Authority of Ireland (2016) Microbial Factsheet Series, “*Bacillus cereus*”

<https://www.fsai.ie/WorkArea/DownloadAsset.aspx?id=1091>

9.

(28) -Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione Europea del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, G.U. dell'Unione Europea L338/1 del 22 Dicembre 2005.

(29) -Regolamento (CE) n. 1441/2007 della Commissione del 5 dicembre 2007 che modifica il Regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari (Gazzetta Ufficiale L 322/12).

(30) -C. Cantoni, Libero docente In Ispezione degli alimenti di origine animale, S. Perillo, Medico Veterinario (2015) "Batteri del bacillus group negli alimenti"

<http://profcarlocantoni.blogspot.com/2015/01/normal-0-false-false-false-it-x-none-x.html>.

(31) -Arnesen SLP, Fagerlund A, Granum PE (2008) From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews* 32:579–606.

(32) -UNITUS "Contaminanti negli alimenti"

<http://www.didattica.unitus.it/web/scaricatore.asp?c=e55xc7hh045lyga8s6m3hglyv&par=1>.

(33) -Rentokil "Sicurezza e igiene alimentare"

<https://www.rentokil.it/sicurezza-e-igiene-alimentare/tossinfezioni-alimentari/>.

(34) -C. Rizzo, I. Luzzi, Alfredo Caprioli, M. L. Ciofi degli Atti, Istituto Superiore di Sanità "Disamina dei dati nazionali disponibili in materia di zoonosi, con particolare attenzione ai focolai di tossinfezione alimentare (TA)"

https://www.epicentro.iss.it/veterinaria/pdf/zoonosi_tossinf.pdf.

(35) -D. Adriano, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Lazio e Valle D'Aosta (2015) Capitolo libro: La sicurezza alimentare in Piemonte: vecchie istituzioni e nuovi compiti "Gestione dei casi di MTA secondo le procedure del Laboratorio Controllo Alimenti".

(36) -Regolamento (CE) N. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare, G. U. delle Comunità Europee n. L 31/1 del 1 febbraio 2002.

(37) -Regolamento (CE) n. 1935/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 27 ottobre 2004 riguardante i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari e che abroga le direttive 80/590/CEE e 89/109/CEE.

(38) -Regolamento (CE) n. 183/2005 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 12 gennaio 2005 che stabilisce requisiti per l'igiene dei mangimi (Gazzetta ufficiale dell'Unione europea - L 35/1).

(39) -Ministero della Salute, RELAZIONE ANNUALE AL PNI 2018 (luglio 2019) "ALLERTA PER ALIMENTI E MANGIMI – RASFF"

<http://www.salute.gov.it/relazioneAnnuale2018/dettaglioRA2018.jsp?cap=capitolo5&sez=ra18-5-5c-ulteriori&id=2354>.

(40) -Unife "La prevenzione della proliferazione"

<http://www.unife.it/medicina/dietetica/insegnamenti/scienze-del-management-sanitario/modulo-di-gestione-e-controllo-della-sicurezza-alimentare/60k-la-prevenzione-della-proliferazione.pdf/view>.

(41) -Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali (GU L 165 del 30.4.2004).

(42) -Journal of Clinical Microbiology (2005) K. Dierick, E. Van Coillie, I. Swiecicka, G. Meyfroidt, H. Devlieger, A. Meulemans, G. Hoedemaekers, L. Fourie, M. Heyndrickx, J. Mahillon, “Fatal Family Outbreak of Bacillus cereus-Associated Food Poisoning”
<https://jcm.asm.org/content/43/8/4277>.

(43) -Kramer JM, Gilbert RJ (1989) “Bacillus cereus and other Bacillus species”. Ch 2 In: Doyle MP (ed) Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker, New York, p. 21–70).

(44) -Becker H, Schaller G, Von Wiese W, Terplan G (1994) “Bacillus cereus in infant foods and dried milk products”
International Journal of Food Microbiology 23(1):1–15.

(45) -California Retail Food Code (CalCode), part 7, sezione 114419(3) (2018) Sonoma County Department of Health Services Environmental Health “Sushi Rice HACCP Plan Guidelines”
<https://www.cdph.ca.gov/Programs/CEH/DFDCS/CDPH%20Document%20Library/FDB/FoodSafetyProgram/RetailFood/CRFC.pdf>.

(46) -National Center for Biotechnology Information (2006) “Survival and growth of foodborne pathogens during cooking and storage of oriental-style rice cakes”
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17186677>.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare in primis il Dott. Francesco Renzi che ha accettato l'incarico di relatore, ma soprattutto per essere stato sempre disponibile e collaborativo durante la stesura di questa tesi.

Ringrazio la mia famiglia, i miei genitori e i miei fratelli per avermi supportato, ma soprattutto sopportato in questi anni.

Ringrazio anche Daniele che mi ha sostenuto in tutti i momenti, sia belli che meno belli, di questa carriera universitaria, regalandomi sempre pensieri e parole di incoraggiamento.

Ringrazio le mie amiche per essermi state sempre vicino, sia fisicamente sia con il pensiero, facendomi vedere sempre il lato positivo delle cose.