



**Università di Sassari**

Facoltà di Medicina Veterinaria

---

***Dottorato di Ricerca in***

Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale

XXI Ciclo

**Valutazione dell'igiene degli animali al  
macello e procedure di decontaminazione  
delle carni per minimizzare il rischio  
microbiologico.**

*Coordinatore:*

Chiar.mo Prof. A. M. Cosseddu

*Docente Guida:*

Chiar.mo Prof. Enrico De Santis

*Correlatore:*

Chiar.mo Dott. Andrea Serraino

*Tesi di Dottorato:*

*Dott.ssa Raffaella Riu*

ANNO ACCADEMICO 2007-2008

Raffaella Riu, Valutazione dell'igiene degli animali al macello e procedure di decontaminazione delle carni per  
minimizzare il rischio microbiologico

Dottorato di Ricerca in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale  
Università degli Studi di Sassari

## Indice

INTRODUZIONE .....	4
LE CARNI E LA SICUREZZA ALIMENTARE.....	8
GLI ANIMALI E LE CONTAMINAZIONI MICROBICHE NELLA FILIERA DELLE CARNI.....	19
IMPORTANZA DELLA CUTE NELLA CONTAMINAZIONE MICROBICA DELLA CARNE. ...	26
IGIENE DEGLI ANIMALI .....	30
METODI DI DECONTAMINAZIONE DI CUTE E CARCASSE.....	48
DECONTAMINAZIONE DELLA CUTE .....	53
METODI DI DECONTAMINAZIONE DELLA CARCASSA .....	58
APPLICAZIONE PRATICA DI UNO STRUMENTO DI VALUTAZIONE DEL GRADO DI PULIZIA DI BOVINI PRESENTATI AL MACELLO .....	74
MATERIALI E METODI .....	75
VALUTAZIONE DEI SOGGETTI .....	86
RISULTATI.....	89
CONSIDERAZIONI.....	92
ACQUA OSSIDANTE ELETTROLIZZATA (EO) .....	96
MATERIALI E METODI .....	97
PREPARAZIONE DELLE COLTURE BATTERICHE.....	97
CARICA MESOFILA TOTALE .....	97
SALMONELLA TYPHIMURIUM .....	98
STAPHYLOCOCCUS AUREUS .....	99

LISTERIA MONOCYTOGENES .....	100
ESCHERICHIA COLI .....	101
CONTAMINAZIONE DELLE CARNI .....	103
CONTAMINAZIONE DELLE CARNI .....	105
ISOLAMENTO E CONTA DEI MICRORGANISMI .....	109
DETERMINAZIONE DEL NUMERO DEI PEROSSIDI IN PRODOTTI CARNEI TRATTATI CON SOLUZIONE 259.....	112
RISULTATI.....	116
NELLA TABELLA N.15 SONO RIPORTATI I RISULTATI DEI TEST DI INATTIVAZIONE DELLA POPOLAZIONE DI CARICA MESOFILA TOTALE E DEI PATOGENI TESTATI SU CARNI BOVINE, SUINE E AVICOLE. ....	119
ELABORAZIONE DEI DATI.....	123
CONSIDERAZIONI.....	125
CONCLUSIONI.....	128
ALLEVAMENTO .....	130
A LIVELLO COMMERCIALE .....	131
A LIVELLO DI TRASPORTO .....	131
A LIVELLO DI MACELLO .....	132
BIBLIOGRAFIA.....	138

## Introduzione

Nei paesi industrializzati il 30% della popolazione viene colpita ogni anno da malattie trasmesse dagli alimenti. Negli USA l'incidenza è stimata in 76 milioni di casi per anno, cui conseguono più di 325.000 ospedalizzazioni e oltre 5.000 decessi. In Italia le stime sono di circa 300.000 casi/anno, ma le statistiche, a causa di mancate segnalazioni e/o diagnosi inesatte, sottostimano la reale incidenza di queste patologie (dati WHO, 2008). La gestione della sicurezza è attuata attraverso l'adozione di misure di controllo preventive finalizzate a minimizzare, per quanto possibile, la contaminazione e lo sviluppo dei microrganismi patogeni in ogni fase della catena alimentare. Non si possono, infatti, ottenere alimenti sicuri se non si mantengono sotto controllo tutte le fasi del processo produttivo: allevamento, trasporto, lavorazione, distribuzione, vendita e non da ultimo la preparazione per il consumo.

Nel corso degli ultimi anni le metodologie di gestione della sicurezza alimentare consolidate, si fondano sull'applicazione integrata e sistematica dei piani di HACCP e delle buone pratiche di fabbricazione (GMP) e delle procedure di corretta prassi igienica (GHP).

L'applicazione di metodologie a carattere preventivo fondate sul controllo di processo risulta efficace se attuata in ciascuna fase della filiera. Gli Operatori del Settore Alimentare nel progettare ed applicare il proprio sistema di autocontrollo devono

considerare nella misura appropriata le interazioni che si determinano fra i differenti fattori della produzione (materie prime, igiene degli ambienti di produzione/lavorazione, operatori, etc.) nelle differenti fasi del processo.

Nella filiera delle carni le crisi che negli ultimi anni hanno riguardato aspetti relativi alla sicurezza alimentare, hanno evidenziato l'importanza della produzione primaria quale parte integrante del processo produttivo. Le problematiche connesse alle TSE o alle contaminazioni da diossina hanno dimostrato l'importanza di un'attenta valutazione del rischio connesso alle produzioni associata all'adozione di corrette ed efficaci misure di prevenzione. Ad esempio le complesse misure di prevenzione attualmente adottate nell'ambito della produzione delle carni, comprendono strumenti quali la selezione di genotipi resistenti, il bando delle farine animali, la definizione delle categorie di età dei bovini destinati macellazione, l'adozione di procedure per l'asportazione ed eliminazione di materiali che comportano un rischio specifico.

Anche per il controllo dei pericoli microbiologici, la produzione primaria riveste un ruolo di fondamentale importanza e capace di influenzare in maniera determinante le caratteristiche microbiologiche del prodotto (FSA, 2004). Nel settore delle carni fresche nelle successive fasi di macellazione, sezionamento e confezionamento le procedure e tecnologie adottate hanno la prevalente finalità di contenere ulteriori contaminazioni e limitare lo sviluppo dei microrganismi. Alcuni punti di controllo critico nella fase di macellazione, quali ad esempio eviscerazione e scuoiamento, hanno notevole importanza nel minimizzare il rischio derivante dalle contaminazioni o lo sviluppo di microrganismi patogeni di rilevante impatto epidemiologico (Edwards and

**Raffaella Riu, Valutazione dell'igiene degli animali al macello e procedure di decontaminazione delle carni per minimizzare il rischio microbiologico**

**Dottorato di Ricerca in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale  
Università degli Studi di Sassari**

Fung, 2006). Sono limitate o poco applicate le possibilità di impiego di metodi di risanamento (trattamenti termici o alternativi).

I criteri microbiologici definiti dalla Legislazione Comunitaria attribuiscono notevole importanza ai microrganismi patogeni veicolati dalle carni. Sono numerosi i criteri di sicurezza o di igiene che hanno quale matrice alimentare di riferimento le carni. I criteri microbiologici applicabili per la valutazione delle carcasse degli animali macellati hanno per finalità la verifica dei risultati ottenuti da parte dell'OSA con l'attuazione delle procedure igieniche, inclusa la valutazione del trend del controllo di processo. Soprattutto negli USA sono state sviluppate iniziative e misure anche cogenti, prioritariamente finalizzate al controllo dei patogeni nella macellazione, destinate a rafforzare le SOPs (Standard Operating Procedures) e rendere proporzionale il monitoraggio microbiologico rispetto all'efficacia delle misure di controllo igienico.

Alcuni dei più importanti agenti batterici responsabili di malattie ad elevata incidenza trasmesse da alimenti (*Campylobacter* spp., *Salmonella* spp, *E. coli* enteropatogeni) sono veicolati attraverso le carni, soprattutto i c.d. "patogeni enterici" (Huffman, 2002). Questi germi risultano direttamente coinvolti nelle contaminazioni durante le fasi di macellazione potendo essere trasferiti dall'intestino alla cute e da questi alle carcasse durante le operazioni di eviscerazione e scuoiamento (Nastasijevic *et al.*, 2008; McEvoy *et al.*, 2000a).

La presente tesi riporta i risultati di attività di ricerca e sperimentazione sviluppate con l'obiettivo di valutare l'applicazione di differenti procedure atte a ridurre la

contaminazione delle carcasse e delle carni bovine. La prima parte ha per oggetto l'elaborazione e l'impiego di un protocollo per valutare l'igiene degli animali macellati, definendo appropriati indici e categorie basati sul grado di pulizia dei soggetti. La seconda parte riguarda la valutazione sperimentale dell'utilizzo di soluzioni di Acqua Ossidante Elettrolizzata (EOW) su matrici carnee, quale strumento da impiegare per il controllo delle contaminazioni batteriche delle carni.

L'obiettivo è di rafforzare le misure di controllo già adottate (igiene degli animali), rendendone più oggettiva la valutazione e proporre l'introduzione di altre innovative (decontaminazione) per rendere più efficace il controllo integrato della sicurezza alimentare nella filiera delle carni, riducendo il rischio associato ai microrganismi patogeni.

## Le carni e la Sicurezza Alimentare.

La carne riveste un'importanza fondamentale dal punto di vista nutrizionale e dietetico, ma nello stesso tempo può costituire un fattore di rischio per la salute pubblica.

Le contaminazioni a cui può andare incontro la carne sono numerose e possono derivare da contaminazioni che si verificano sia durante la vita dell'animale (contaminazioni endogene), sia durante le varie fasi del processo produttivo (contaminazione esogene).

Le contaminazioni endogene possono derivare da sostanze somministrate volontariamente all'animale (farmaci e anabolizzanti) o da sostanze che siano state accidentalmente assunte dall'animale attraverso alimenti o acqua (pesticidi, metalli pesanti, micotossine, PCB, etc.). Tra le contaminazioni endogene, un ruolo importante viene assunto dai cosiddetti "pericoli biologici" responsabili di zoonosi, quali parassiti (*Toxoplasma gondii*, *Trichinella spp*, *Cysticercus bovis* e *Cysticercus cellulosae*), batteri (brucelle, micobatteri tubercolari, *Burkholderia mallei*, *Bacillus anthracis* etc.) e agenti non convenzionali, come le proteine prioniche delle encefalopatie spongiformi trasmissibili del bovino e degli ovini (TSE) (Colavita, 2008).

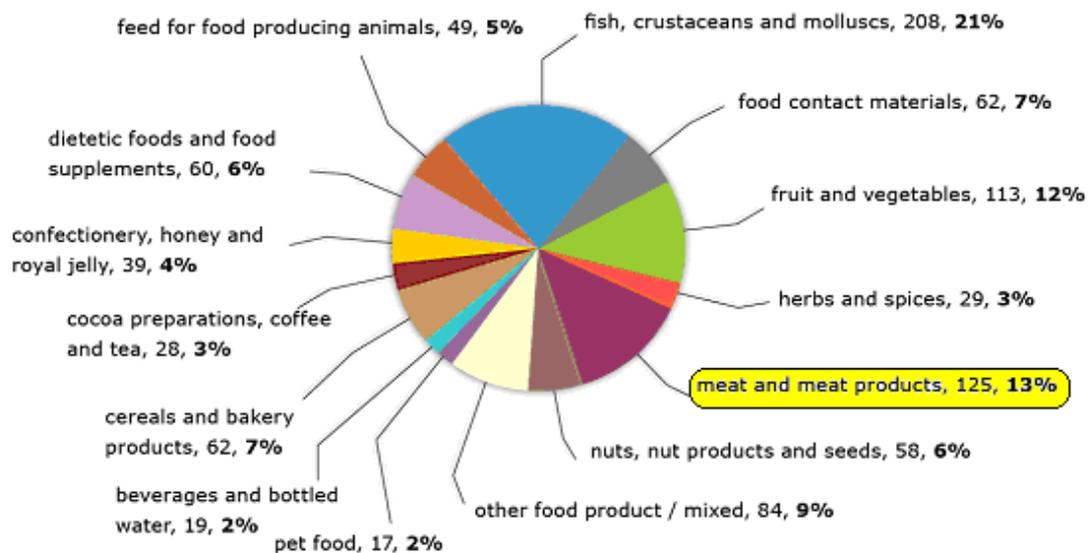
Le contaminazioni endogene delle carni sono essenzialmente riconducibili a batteri responsabili di tossinfezioni alimentari quali, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia*, *Yersinia* e *Aeromonas*, Gram-positivi sporigeni quali *Clostridium* e *Bacillus* e infine

Gram-positivi asporigeni appartenenti ai generi *Listeria* e *Staphylococcus* (Colavita, 2008). Questi microrganismi, si trovano prevalentemente nel tratto digerente e sulla cute degli animali e possiedono elevata capacità di sopravvivenza nell'ambiente esterno. I soggetti portatori, che non presentano dunque sintomatologia clinica, sono i principali "disseminatori" di questi microrganismi nell'ambiente, ragion per cui alcune fasi della macellazione quali lo scuoiamento, la depilazione, e l'eviscerazione, rappresentano i momenti in cui possono avvenire le maggiori contaminazioni delle carcasse, dell'ambiente e delle attrezzature. La qualità igienica della carne dipenderà, dunque, da una parte dalle contaminazioni derivate dal processo di macellazione e sezionamento, così come dalla capacità di crescita dei microrganismi durante le fasi di raffreddamento, stoccaggio e distribuzione.

Nel corso del 2007 le notifiche di allerta pervenute al "The Rapid Alert System for Food and Feed" (RASFF, 2007) sono state in totale 953, di queste 125, il 13% del totale, hanno riguardato la carne e i prodotti a base di carne (escluse le carni di pollame) (grafico n. 1) mentre le "Information Notification" sono state in totale 1972, di cui 97 hanno interessato la carne e i prodotti a base di carne (escluse le carni di pollame). Delle 953 notifiche d'allerta pervenute al RASFF nel corso del 2007, ben 198, il 20% del totale, si riferivano al rischio presenza di (potenziali) microrganismi patogeni. Per quanto riguarda le notifiche di allerta ripartire in base ai pericoli e alle categorie di prodotto, il report RASFF 2007, riporta 58 notifiche per pericoli microbiologici nella carne e prodotti a base di carne diversi dalle carni di pollame, di cui la maggior parte riferite al pericolo presenza di *Salmonella*.

Grafico n.1 - Notifica di allerta nel 2007, in base alla categoria di prodotto (RASFF, 2007).

### 2007 Alert notifications according to product category



Diversi microrganismi potenzialmente pericolosi possono ritrovarsi nell'intestino, le deiezioni e sulla pelle degli animali sani. Questi microrganismi quali per esempio *E. coli* patogeni, particolarmente *E.coli O157:H7*, *Salmonella* e *Campylobacter*, sono capaci di provocare delle infezioni alimentari nell'uomo (Edwards and Fung, 2006).

La relazione annuale sulle zoonosi pubblicata dall'Autorità Europea sulla Sicurezza Alimentare, ha evidenziato come l'infezione da *Campylobacter* rappresenti la zoonosi più trasmessa all'uomo in Europa, con ben 175.561 casi confermati nel 2006, arrivando

a superare le infezioni causate da *Salmonella*. Secondo tale rapporto, la fonte principale di infezioni da *Campylobacter* risulta essere la carne fresca di pollame, con una percentuale di campioni positivi fino al 66,3%; ciò nonostante, *Campylobacter* è stato comunemente isolato da una varietà di altre matrici alimentari tra le quali carni fresche suine e bovine, anche se con positività spesso inferiori al 5% (EFSA, 2007). D'altro canto però il bovino rappresenta un normale reservoir per *Campylobacter* e la presenza di quest'ultimo nelle feci bovine è stata ripetutamente descritta; il tasso di prevalenza osservato negli animali da carne in età da macellazione risulta variabile dal 47% al 72.4% e la specie predominante riscontrata è *C. jejuni* (Rondanelli *et al.*, 2005). Per quanto riguarda *Salmonella* nonostante l'alimento maggiormente coinvolto nelle infezioni alimentari da questo microrganismo siano le uova, è stata ritrovata molto spesso in carne fresca di pollo e maiale, con positività dei campioni rispettivamente di 5,6% e 1.0% (EFSA, 2007). Nei paesi dell'UE in cui è attivo il programma di monitoraggio e sorveglianza della Salmonellosi, la positività al microrganismo in campioni di carne bovina è stata abbastanza bassa. Nel 2006, tutti i paesi in cui è attivo il sistema di monitoraggio e sorveglianza hanno riportato positività intorno allo 0,5%. I dati riguardanti la positività a *Salmonella* su campioni di carne fresca bovina nel periodo 2002-2006 sono illustrati nella tabella n. 1 (EFSA, 2007).

Tabella n.1 - Salmonella in campioni di carne fresca bovina nei Paesi in cui è stato attivato il programma di sorveglianza 2002-2006 (EFSA, 2007).

	2006		2005		2004		2003		2002	
	N	% Pos								
<b>Bovine meat sampled at slaughterhouse (sample based) - carcass swabs</b>										
Belgium	69	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Czech Republic	3,466	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Denmark <sup>1</sup>	8,155	0.2	9,550	0.6	10,695	0.5	11,660	0.4	12,700	0.2
Estonia	320	0.3	388	0	371	0	-	-	-	-
Finland	3,237	0.1	3,218	0	3,251	0	3,406	<0.1	3,146	<0.1
Slovenia	44	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Sweden	3,510	<0.1	3,297	<0.1	3,475	0	3,220	<0.1	3,121	0
Norway	2,035	0	2,076	0	2,136	0	2,600	0	2,419	0
<b>Bovine meat sampled at slaughterhouse and cutting plants</b>										
Estonia <sup>2</sup>	226	0	343	0.6	310	4	-	-	-	-
Estonia <sup>3</sup>	78	0	85	0	60	0	-	-	-	-
Finland <sup>3</sup>	2,261	0	2,370	0	2,485	<0.1	2,404	0.1	1,948	0.4
Slovenia <sup>3</sup>	155	0	107	0	-	-	-	-	-	-
Sweden <sup>3, 4</sup>	3,898	<0.1	4,119	0	4,474	0	4,411	0	4,478	0
<b>Bovine meat sampled at retail</b>										
Belgium <sup>5</sup>	-	-	171	0.6	98	0	207	0.5	2,041	2.9
<b>EU Total</b>	<b>25,419</b>	<b>0.1</b>	<b>23,648</b>	<b>0.3</b>	<b>25,219</b>	<b>0.3</b>	<b>25,308</b>	<b>0.2</b>	<b>27,434</b>	<b>0.3</b>

*Listeria monocytogenes*, è un microrganismo ubiquitario spesso presente nell'ambiente. I principali reservoirs di *Listeria* sono il suolo, i foraggi e l'acqua. Altri importanti reservoirs del microrganismo, sono gli animali domestici portatori capaci di trasferire il microrganismo all'uomo attraverso gli alimenti da essi derivati. In Europa i casi umani di listeriosi confermati in laboratorio nel corso del 2006 sono stati 1.583. I cibi maggiormente responsabili si sono dimostrati come negli anni precedenti i prodotti ready-to-eat soprattutto a base di pesce (EFSA, 2007). Per quanto riguarda le carni bovine, solo in Francia sono stati in ritrovati alimenti a base di carne bovina cotti, quantitativi del microrganismo superiori alle 100 ufc/g (EFSA, 2007).

*Escherichia coli* è un normale saprofito nell'intestino dell'uomo e degli animali. Gli stipti che hanno acquisito e mostrano caratteri di virulenza sono numerosi e sono capaci di causare malattia nell'uomo (Colavita, 2008). I quattro principali gruppi in cui vengono classificati gli *E.coli* in base a caratteristiche clinico-patologiche sono: enterotossigeni o ETEC, enteropatogeni o EPEC, enteroinvasivi o EIEC, Enteroaggressivi o EAEC ed enteroemorragici o EHEC. I ceppi di *E. coli* enterotossigeni (ETEC), sono responsabili della produzione di tossine termolabili (LT) e termostabili (ST) e possono contaminare l'acqua e gli alimenti, con maggiore frequenza nei paesi meno sviluppati. Gli stipti Enteropatogeni (EPEC), causano sindromi da malassorbimento per alterazione dei microvilli delle cellule intestinali. Gli stipti Enteroinvasivi (EIEC) difficilmente sono isolati dagli alimenti, determinano invasione delle cellule dell'intestino crasso e distruzione della mucosa causando febbri dissenteriche, intensi crampi addominali ed emissione di feci prima liquide poi sanguinolente. Gli stipti Enteroaggressivi (EAEC), capaci di contaminare acqua e alimenti grazie alla loro capacità di aderire alle cellule intestinali, sono spesso causa di diarrea persistente, soprattutto nei bambini.

I cosiddetti ceppi enteroemorragici (EHEC) hanno quale capostipite il sierotipo O157:H7 e altri sierotipi patogeni non-O157:H7 quali O103:H2, O26:H11, O111 etc., in grado di produrre tossine e patologie nell'uomo simili a quelle provocate dall'O157:H7 (O'Hanlon, 2004). Il loro potere patogeno si esplica grazie alla capacità di elaborare due potenti citossine Shiga-like (SLT-1 e SLT-2) dette anche verotossine (VT-1 e VT-2), capaci di interessare anche organi molto distanti quali il cervello (Wang *et al.*, 2002).

Questi microrganismi sono responsabili di gravi forme di malattia caratterizzate da colite emorragica (CE) e sindrome uremica-emolitica (SEU) che, nei casi più gravi, possono portare al decesso. La spiccata virulenza degli *E. coli* produttori di verocitotossine, dimostrata dalla bassa dose infettante (stimata inferiore a 50 cellule), hanno determinato la loro inclusione tra le zoonosi da sottoporre a sorveglianza in ambito umano e veterinario nei Paesi membri dell'Unione Europea (Direttiva (CE) 2003/99).

La carne bovina, in particolare quella poco cotta, è ritenuta uno degli alimenti maggiormente responsabili di trasmissione all'uomo di ceppi patogeni di *Escherichia coli*. In Inghilterra le tossinfezioni causate da consumo di carne, soprattutto macinata, vengono spesso chiamate "Hamburger Disease", testimoniando l'importanza attribuita alle carni bovine nei focolai epidemici (Colavita, 2008).

Le infezioni da ceppi VTEC di *E.coli*, rappresentano un serio problema di sanità pubblica in tutti i paesi industrializzati, in particolare USA, Europa, Giappone, Canada e Australia. I casi di infezione da parte di *E.coli*, sono per la maggior parte associati al consumo di carne bovina poco cotta (Koomharaie *et al.*, 2005) e ben il 45-52% dei focolai di *Escherichia coli* O157:H7, sono riconducibili al consumo di prodotti carnei (WHO, 1997, 2002).

In Europa ventidue MS (Paesi Membri) hanno segnalato nel 2006 casi di infezioni umane da parte di VTEC. Il TESSy (The European Surveillance System) riporta 4.916 casi di VTEC di cui 99.8% confermati da indagini di laboratorio; presentando un incremento

di 1.694 casi rispetto all'anno precedente (EFSA, 2007). In realtà analisi statistiche dimostrano che l'incidenza in Europa di casi di VTEC, è in significativo decremento rispetto al 2004. L'incremento registrato nel 2006 è dovuto alle oltre 1.550 segnalazioni riportate dalla Repubblica Ceca nel corso del 2006 (EFSA, 2007). I casi umani di VTEC registrati tra il 2003 e il 2006 sono riportati nella seguente tabella n. 2 (EFSA, 2007).

Tabella n. 2 - Casi di infezione da VTEC nell'uomo in Europa, triennio 2003-2006 (EFSA, 2007).

	2006				2005	2004	2003
	Report type <sup>2</sup>	Total cases	Confirmed cases	Confirmed cases/100,000 population	Total cases		
Austria	C	41	41	0.5	53	45	28
Belgium	A	47	47	0.4	-	36	39
Czech Republic	C	1,561	1,558	15.2	-	1,743	-
Denmark	C	146	146	2.7	154	163	128
Estonia	C	8	8	0.6	19	0	
Finland	C	14	14	0.3	21	10	14
France	C	67	67	0.1	-	-	-
Germany	C	1,183	1,183	1.4	1,162	903	1,100
Greece	C	1	1	<0.1	-	-	-
Hungary	C	3	3	<0.1	5	12	20
Ireland	C	158	153	3.6	125	61	95
Italy	-	17	17	<0.1	-	3	5
Lithuania	A	0	0	<0.1	-	-	-
Luxembourg	C	2	2	0.4	8	-	-
Malta	C	21	21	5.2	23	-	-
Netherlands	C	41	41	0.3	64	30	51
Poland	C	4	4	<0.1	4	3	-
Slovakia	C	8	8	0.1	61	4	1
Slovenia	C	30	30	1.5	-	2	-
Spain	C	13	13	<0.1	16	-	-
Sweden <sup>3</sup>	C	265	265	2.9	336	149	52
United Kingdom	C	1,294	1,294	2.1	1,171	926	974
<b>EU Total</b>		<b>4,924</b>	<b>4,916</b>	<b>1.1</b>	<b>3,222</b>	<b>4,090</b>	<b>2,507</b>
Iceland	C	1	1	0.3	-	-	-
Norway	C	50	50	1.1	18	12	15
Switzerland	C	64	48	0.6	62	45	56

1. EU-total incidence is based on population in reporting countries

2. A: Aggregated data; C: Case based

3. In Sweden, in July 2004 the reporting system changed so all serovars became notifiable, before this date only VTEC O157 was notifiable

While the majority of reported human VTEC infections are associated with the O157 serogroup, the proportion of non-O157 VTEC infections among known serogroups have increased from 2005 to 2006 and in 2006 almost half of all cases caused by known serogroups were non-O157. The main reason for this increase is the reported cases of non-O157 VTEC from the Czech Republic; Table VT3.

In Italia l'incidenza delle infezioni di VTEC è relativamente bassa se confrontata con quella osservata in Nord Europa e in US. Nel nostro paese l'incidenza media annuale di

**Raffaella Riu, Valutazione dell'igiene degli animali al macello e procedure di decontaminazione delle carni per minimizzare il rischio microbiologico**

**Dottorato di Ricerca in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale  
Università degli Studi di Sassari**

SEU nel periodo compreso tra il 1988 e il 2004 (Grafico n. 2) è stata di 0,27 casi ogni 100.000 abitanti (popolazione compresa tra gli 0 e i 15 anni), contro lo 0,4 – 0,9/100.000 di Francia ed Austria e 1 – 2/100.000 del Regno Unito (Rete Internazionale di Sorveglianza per le infezioni enteriche da Salmonella e da VTEC O157, 2008). Non essendo obbligatoria in Italia la segnalazione dei casi di VTEC, si tratta di dati riferiti su base volontaria al sistema di sorveglianza della SEU in età pediatrica. I sierotipi di VTEC diagnosticati nei casi di SEU pediatrica nel periodo 1988-2004, sono illustrati nel grafico n. 3.

Grafico n. 2 - Tasso nazionale incidenza SEU anni 1988-2004 (Dati ENTER-NET ITALIA).

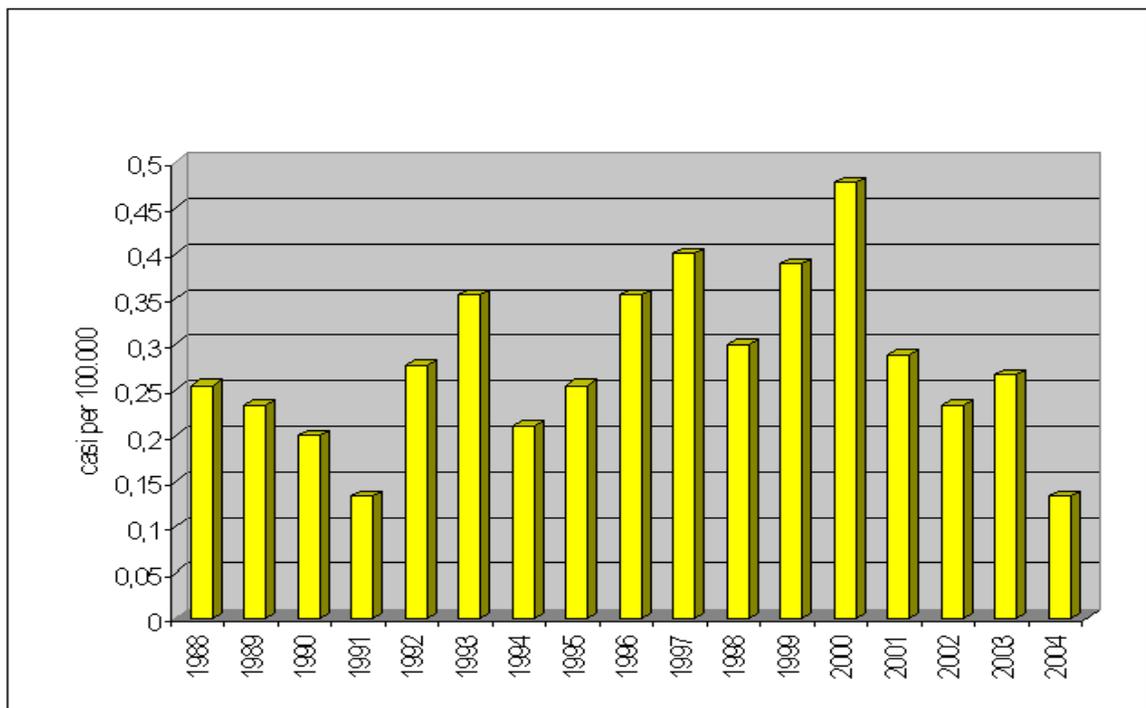
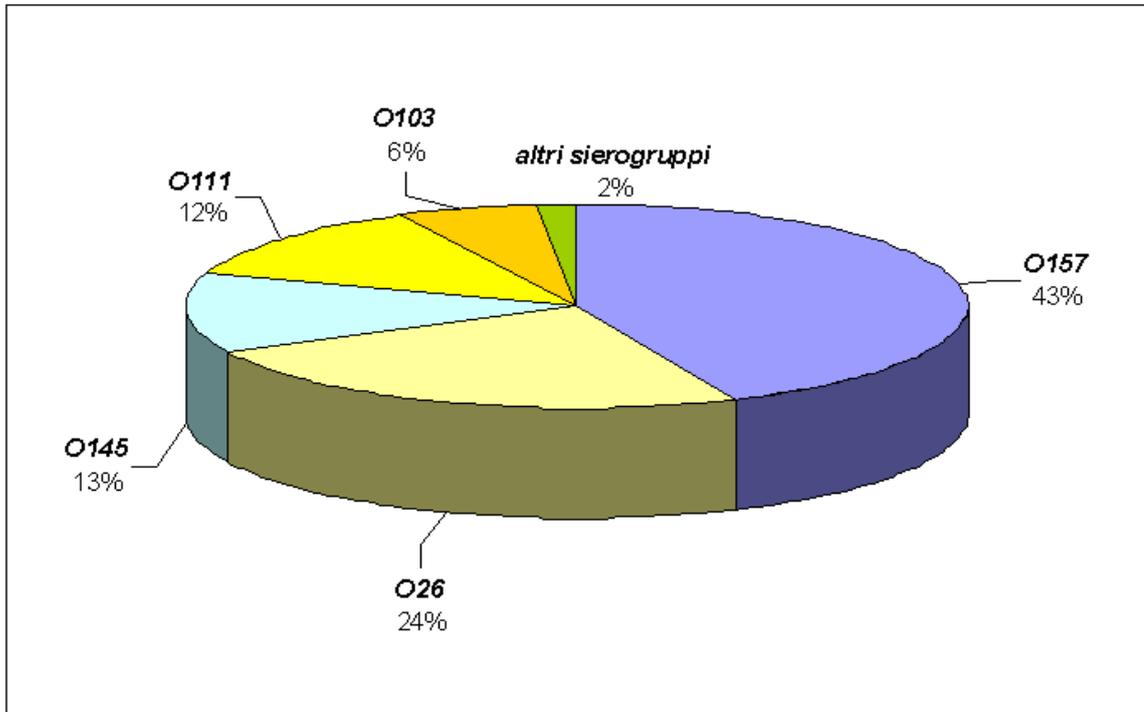


Grafico n. 3 - Sierotipi di VTEC diagnosticati nei casi di SEU pediatrica nel periodo 1988-2004 (DATI ENTERNET-ITALIA).



## Gli animali e le contaminazioni microbiche nella filiera delle carni

I microrganismi sono introdotti nella filiera delle carni attraverso gli stessi animali che li veicolano a livello del tubo digerente e della pelle (Rosset, 1982; Rosset et Liger, 1982; Fournaud, 1982.), che costituiscono la principale fonte di contaminazione delle carcasse al momento della macellazione (McEvoy *et al.*, 2000a; Cartier, 1997; Fournaud, 1978).

Gli animali spesso sono portatori del microrganismo senza presentare sintomi di malattia. Il rilascio di questi germi nell'ambiente in alcuni casi può essere massivo, costituendo un potenziale enorme di contaminazione delle superfici corporee di animali a contatto.

I bovini sono considerati i maggiori reservoir di *E.coli* O157:H7, essendo in grado di eliminare il microrganismo in maniera intermittente senza nessun risentimento clinico (Nastasijevic *et al.*, 2008). Alcuni vitelli possono albergare nel proprio organismo concentrazioni di *E. coli* O157:H7 superiori a 5 log cfu/g senza presentare sintomatologia (Zhao *et al.*, 1995).

The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) attribuisce ogni anno circa 73.000 malattie e 60 morti a *E. coli* O157:H7, produttore di Shigatossine toxin-producing (*E. coli* STEC) e responsabile dell'epidemia registratasi nel 1993. I ricercatori dell'Agricultural Research Service (ARS), agenzia di ricerca del USDA (United State

Department of Agriculture), hanno dimostrato che questo patogeno dalle feci degli animali portatori è in grado di aderire alla cute e tramite questa provocare la contaminazione delle carcasse durante il processo di scuoiamento (USDA, 2006).

Ormai da anni l'USDA sostiene una politica di tolleranza zero nei confronti delle contaminazioni fecali sulle carcasse. Procedure di sanitizzazione e metodi di intervento vengono utilizzati durante le operazioni di macellazione al fine di prevenire o eliminare le contaminazioni fecali, le cross-contaminazioni e ridurre la carica batterica (USDA Library, 2002).

Al momento della macellazione la contaminazione delle carcasse è inevitabile, poiché la carne, inizialmente sterile, entra in contatto con le contaminazioni ambientali (aria, acqua, materiali, uomo, etc.). Il numero e la specie dei batteri con cui si entra a contatto in questo stadio sono determinanti, in quanto definiscono la qualità igienica dei prodotti che saranno ottenuti a partire da queste carni.

Dopo il 1996, la messa in opera dei piani Haccp ha prodotto un'applicazione più regolare delle misure igieniche di macellazione, ma non può consentire di eliminare completamente il rischio di contaminazione in quanto le superfici preventivamente "sterili" delle carcasse vengono a contatto con l'ambiente esterno spesso ricco di possibili fonti di contaminazione.

Studi recenti dimostrano, infatti, che la prevalenza di contaminazioni da parte di *Escherichia coli* O157:H7 su carcasse bovine, si aggira ancora a livelli prossimi al 11% (Alonso *et al.*, 2007) e i bovini risultano essere i principali reservoir ed eliminatori nelle

feci di *Escherichia coli* O157:H7 (Nastasijevic et al., 2008; Renter and Sargeant 2002; Elder et al., 2000; Chapman et al., 1997; Hancock et al. 1997; Rice et al., 1997; Faith et al., 1996; Cray and Mood 1995;). Gli studi riportano una prevalenza di *E. coli* O157:H7 nelle feci e a livello intestinale piuttosto variabile. Studi condotti dall'Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) indicano che l'1,8% dei campioni di feci bovine contengono questo patogeno (Elder et al., 2000), con una prevalenza nell'intestino di bovini da carne e da latte intorno al 10% (Gansheroff and O'Brien, 2000). Dati del Food Safety and Inspection Service (FSIS) riportano, invece, che il 28% degli animali avviati alla macellazione albergano *Escherichia coli* O157:H7 nel loro intestino e che, successivamente alla macellazione, il 43% delle carcasse risulta contaminato da tale microorganismo (FSIS, 2002).

La superficie della carcassa è essenzialmente sterile (Gill et al., 1976,1978) ma durante il processo di macellazione le contaminazioni sono inevitabili (Elder et al., 2000; Belk 2001). Durante la macellazione possono essere trasferiti sulla superficie della carcassa anche 3 log cfu/cm<sup>2</sup> (Arthur et al., 2005). Tali operazioni sono inoltre capaci di trasferire sulla carne eventuali microrganismi patogeni di cui sono portatori gli animali (McEvoy et al. 2003b). Uno studio condotto dalla Colorado State University, su materiale fecale prelevato dal colon di bovini successivamente all'eviscerazione, ha evidenziato ben il 72% di positività ad *Escherichia coli* O157:H7, e 37% di positività allo stesso microorganismo sono state ritrovate in campioni di cute di soggetti pronti allo scuoiamento (prelievo tramite tampone sterile a livello del petto).

Alcune aree della carcassa, in corrispondenza della punta del petto, dei fianchi e dei garretti sono maggiormente suscettibili alla contaminazione (Johanson *et al.*, 1983). Le contaminazioni fecali e i microrganismi patogeni, tendono ad aderire in maggior misura alle superfici della carcassa più ricoperte di grasso (Handing *et al.*, 1995). La zona anale, lo scamone e le estremità, mostrano una più elevata contaminazione anche a seguito di un'attenta tolettatura e lavaggio della carcassa (Gill *et al.*, 1995).

La scuoiatura della carcassa e la sua eviscerazione sono considerate le fasi che determinano un elevato rischio di contaminazione. Le contaminazioni possono originare per contatto diretto o indirettamente da pareti, pavimenti, aria, personale, indumenti, impianti, attrezzature e strumenti impiegati, quali i coltelli utilizzati per le operazioni di scuoiamento e sezionamento (Fung *et al.*, 2001). Non sono altresì trascurabili le contaminazioni crociate che possono verificarsi dal contatto diretto tra carcasse (Elder *et al.*, 2000). Questo passaggio di microrganismi tra una carcassa e quelle contigue è notevolmente influenzato dalla struttura dell'impianto, dalla velocità della catena di macellazione e soprattutto dalle attività degli operatori (Belk, 2001).

Il grado di contaminazione della cute degli animali macellati e la localizzazione dello sporco, influenzano in maniera prevedibile la qualità delle contaminazioni alla fine del processo di macellazione (Sofos *et al.*, 1999).

### *La fase dello scuoiamento*

Lo scuoiamento dell'animale rappresenta il momento più a rischio di contaminazione, in quanto le attività che vengono compiute richiedono la contemporanea manipolazione della cute dell'animale e delle sue masse muscolari, con possibile trasferimento di microrganismi attraverso le mani, i coltelli, etc. (Edwards and Fung, 2006).

Le tecniche di scuoiamento sono numerose e varia in relazione alla specie animale e al grado di automatizzazione della catena di macellazione.

Nello scuoiamento dei bovini, prima di procedere alla rimozione della pelle si effettua l'asportazione delle estremità degli arti anteriori e delle corna, dopo di che si procede all'asportazione della testa. Le operazioni di scuoiamenti hanno inizio generalmente con l'incisione della cute a livello del perineo, della superficie interna degli arti, della linea mediana dell'addome, del torace e del collo, procedendo poi ad un parziale scuoiamento del sottocute finalizzato alla liberazione dei lembi cutanei che serviranno nelle successive fasi di trazione (Colavita, 2008).

Nel caso lo scuoiamento venga effettuato manualmente gli operatori, afferrati i lembi di cute liberi, procedono mediante coltelli o altri strumenti meccanici al completo scollamento della cute. Se lo scuoiamento è effettuato meccanicamente, i lembi di cute vengono agganciati a catene collegate a particolari "macchine trazionatrici", in grado di scollare dall'alto verso il basso la cute dalla carcassa (Colavita, 2008).

Negli stabilimenti di tipo industriale è in genere preferito l'utilizzo dello scuoiamento meccanico in quanto permette un notevole risparmio di tempo e offre migliori garanzie igieniche riducendo notevolmente l'intervento manuale degli operatori (Colavita, 2008).

E' importante che le operazioni di scuoiamento vengano effettuate da personale correttamente addestrato e che vengano rispettate scrupolosamente le procedure operative e le corrette prassi igieniche, per evitare a tale livello il contatto della carcassa con i lembi di cute. La pratica di pulire e disinfettare accuratamente il materiale durante le operazioni di scuoiatura e ogni qualvolta vengano a contatto con materiale contaminato, e naturalmente la corretta formazione del personale, in modo da minimizzare il più possibile questi trasferimenti di germi, risultano a questo stadio di fondamentale importanza.

La pelle e il mantello o il vello degli animali, sono le principali fonti di contaminazione durante lo scuoiamento. L'efficacia di queste misure sarà senza dubbio favorita nel momento in cui gli animali che vengono avviati alla macellazione si presentano in condizioni igieniche adeguate.

Nei siti della carcassa in cui avviene una rimozione manuale della cute, esiste una correlazione positiva tra pulizia della cute e contaminazione della carcassa (McEvoy *et al.*, 2000b).

L'ultima fase di scuoiamento della carcassa (distacco della pelle dal dorso), anche se effettuata con mezzi meccanici, ha la particolarità di disperdere particelle e batteri

**Raffaella Riu, Valutazione dell'igiene degli animali al macello e procedure di decontaminazione delle carni per minimizzare il rischio microbiologico**

**Dottorato di Ricerca in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale  
Università degli Studi di Sassari**

nell'ambiente circostante. Motivo per cui, nonostante i progressi effettuati in questo campo, rappresenta ancora come nello scorso secolo, un pericolo di contaminazione assolutamente non trascurabile (Cartier, 2004).

In ogni caso, se le fonti di contaminazione della cute sono perfettamente conosciute, troppo poco le misure igieniche adottate negli impianti di macellazione, cercano di intervenire a questo livello.

Negli USA l'applicazione del sistema Haccp nella produzione delle carni, considera l'asportazione della pelle (figura n.1) insieme all'eviscerazione come dei CCP fondamentali per il controllo dei pericoli durante la macellazione (Hulebak e Schlosser, 2002). L'ispezione visiva dei soggetti rappresenta lo strumento in base al quale è possibile effettuare il controllo, mentre la rifilatura delle aree in cui si trova la contaminazione, la riduzione della velocità della linea, il miglioramento della formazione del personale etc., sono le azioni correttive a disposizione del responsabile della produzione.

Figura n.1 - Fase asportazione cute bovini



Raffaella Riu, Valutazione dell'igiene degli animali al macello e procedure di decontaminazione delle carni per minimizzare il rischio microbiologico

Dottorato di Ricerca in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale  
Università degli Studi di Sassari

## **Importanza della cute nella contaminazione microbica della carne.**

Numerosi contributi scientifici hanno riconosciuto l'importanza del tubo digerente nell'escrezione di germi patogeni, mentre è scarsa l'attenzione riservata alla pelle quale veicolo di contaminazione.

I dati disponibili dimostrano che la concentrazione dei microrganismi sulla superficie della pelle varia tra  $10^4$  e  $10^9$  germi/cm<sup>2</sup> a seconda del sito anatomico considerato. Le contaminazioni più importanti si rilevano sulle superfici su cui poggia l'animale nelle fasi di riposo (ventre e punta del petto), dato che il suolo e la lettiera costituiscono le più probabili sorgenti di contaminazione della pelle (Cartier, 1994).

Il ruolo della pelle come fonte di contaminazione per le carcasse è unanimemente riconosciuto. L'entità delle contaminazioni apportate dalla cute è variabile e multiforme le modalità; le manualità dell'operatore, le attrezzature, e l'aria (spesso ricca di particelle) possono rappresentare un veicolo per le contaminazioni microbiche, e misure igieniche di macellazione sono studiate in maniera tale da agire su questi vettori di contaminazione (Cartier, 1997).

La cute dei bovini è riconosciuta come una delle maggiori fonti di contaminazione di *E. coli* O157. Elder *et al.* (2000) riportano una correlazione positiva tra concentrazione nelle feci e presenza sulla cute di *E. coli* O157:H7 e conseguente contaminazione della carcassa durante il processo di macellazione.

Numerosi studi hanno riportato un collegamento tra la contaminazione della cute e contaminazione della carcassa durante il processo di scuoiamento (Bell, 1997; Elder *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2002).

Reid *et al.* (2002) quantificarono la prevalenza di *E. coli* O157 sulla cute bovina della coscia, dei fianchi e del petto immediatamente dopo l'abbattimento, per valutare il conseguente rischio di contaminazione tra cute-carcassa durante il processo di macellazione. Come mostrato da altri studi (McEvoy *et al.*, 2000b), la cute del petto risultò il sito maggiormente contaminato (prevalenza 22% circa); e allo stesso tempo risultò la zona più implicata nella contaminazione delle carcasse durante il processo di scuoiamento. La cute della zona della coscia risultò la meno contaminata (3,3%) (Reid *et al.*, 2002).

Collins *et al.* (2003), in un'indagine condotta su campioni di cute prelevati tramite tampone con spugna in cellulosa sulla cute di 30 bovini di 3 diversi macelli del sud-est dell'Inghilterra, hanno rilevato una prevalenza di microrganismi patogeni rispettivamente del 29% per *Escherichia coli* O157:H7, e 18% per *Salmonella spp.*; la prevalenza di *Campylobacter spp.* è invece stata ritrovata pari a zero (tabella n.3). Il mancato isolamento di *Campylobacter* fu spiegato con il fatto che si tratta di un batterio con minore capacità di sopravvivere sulla cute soprattutto se asciutta. Studi effettuati da Reid *et al.* (2002) utilizzando per la raccolta del campione il metodo del singolo passaggio di spugna, avevano dimostrato che la zona della cute con più elevata prevalenza di microrganismi patogeni risultava quella del petto, tali dati furono poi confermati anche dai risultati ottenuti di Collins *et al.*, 2003 (tabella n. 3).

Tabella n. 3 - Prevalenza di *E.coli* O157, *Salmonella* spp e *Campylobacter*

spp. sulla cute di bovini al macello (Collins *et al.* 2003).

	Area superficie cute		
	Scamone	Fianco	Petto
<b><i>E. coli</i> O157</b>	3.3 <sup>1</sup> (0-6.6) <sup>2</sup>	4.4 (3.3-6.6)	22.2 (16.6-30.0)
<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	2.2 (0-6.6)	8.8 (0-16.6)	10.0 (3.3-13.3)
<b><i>Campylobacterspp.</i></b>	nr	nr	nr

<sup>1</sup>: % media; <sup>2</sup>: % minima e massima; nr: non rilevabile

Nella normale routine di macellazione, la prima linea di taglio durante le operazioni di scuoiamento attraversa centralmente il petto, motivo per cui esso rappresenta un importante fonte di contaminazione per la carcassa (Collins *et al.*, 2003).

Numerosi fattori influenzano il livello di contaminazione della cute degli animali presentati al macello; questi fattori esplicano di conseguenza il loro effetto sulle qualità microbiologiche delle carcasse (Davies *et al.*, 2000).

Il grado di “contaminazione visibile” della cute dei bovini ha dimostrato avere effetti sul livello di contaminazione della carcassa. Anche se, non necessariamente soggetti con cute visibilmente pulita, risultano esenti da contaminazioni da parte di

microrganismi patogeni; dimostrandosi quindi un potenziale pericolo per le cross-contamination da *E. coli* O157:H7 (McEvoy *et al.*, 2000a).

Rivera *et al.* (2004), hanno valutato la prevalenza di *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes* sulla cute di bovini presentati al macello in due diverse regioni degli USA. Dalla loro indagine condotta su animali avviati al macello delle regioni del sud degli Stati Uniti, la prevalenza media di *Listeria* spp. risultò del 37,7%, e del 75,5% per i soggetti delle regioni del nord. La prevalenza di *Listeria monocytogenes* fu rispettivamente pari allo 0,8% e 18,7% nel nord e nel sud del Paese. Guerini *et al.* (2007), hanno evidenziato che la prevalenza di *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* sulla cute di bovini, immediatamente prima delle operazioni di scuoiamento, risulta influenzata dalla stagione dell'anno e apparendo più elevata nei mesi freddi.

Sulla cute degli animali, sono presenti fino a  $10^9$  germi/cm<sup>2</sup> e circa  $10^3$  germi/cm<sup>2</sup> sulla carcassa a fine macellazione, se le procedure di lavorazione sono state igienicamente corrette. Questo indica che, per ottenere un prodotto finito di buona qualità igienico sanitaria, il trasferimento di batteri dalla cute alla carcassa non dovrebbe essere superiore a 1 germe su 1.000.000 (Cartier, 1997).

Le contaminazioni che presentano gli animali sono di varia origine; le condizioni di allevamento giocano un ruolo fondamentale nel determinare quella che sarà la qualità igienica dell'animale presentato al macello.

Una ricerca condotta tra il 1999 e il 2002 per conto della Food Standard Agency, su allevamenti bovini di Gran Bretagna e Scozia, ha messo in evidenza che fattori quali il

**Raffaella Riu, Valutazione dell'igiene degli animali al macello e procedure di decontaminazione delle carni per  
minimizzare il rischio microbiologico**

**Dottorato di Ricerca in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale  
Università degli Studi di Sassari**

sistema di stabulazione degli animali, la lettiera, la dieta ed i cambi repentini nella razione, la grandezza e l'omogeneità dei gruppi, nonché il mantello dei soggetti e la stagione dell'anno, sono fattori in grado di influenzare in senso positivo o negativo il grado di contaminazione microbica della cute degli animali (Collins *et al.*, 2003).

Un ruolo non marginale viene inoltre svolto dalle condizioni di trasporto degli animali (Dewell *et al.*, 2008). Il trasporto degli animali dall'allevamento al luogo di macellazione offre delle condizioni favorevoli all'istaurarsi di contaminazioni crociate tra i soggetti, e crea le premesse per un'omogeneizzazione delle contaminazioni in seno al lotto di animali (Laval *et al.*, 1997). Le esperienze di Collins *et al.* (2003) dimostrarono che prima del trasporto, soggetti con cute visibilmente imbrattata presentano spesso una prevalenza maggiore di E.coli O157, rispetto a soggetti puliti. Al termine delle operazioni di trasporto non sono più rilevabili differenze nella prevalenza tra i soggetti sporchi e puliti (Collins *et al.*, 2003), confermando il possibile trasferimento di microrganismi tra un animale e l'altro durante il trasporto.

## **IGIENE DEGLI ANIMALI**

In ambito internazionale le linee guida del Codex Alimentarius e la normativa comunitaria hanno affrontato la tematica dell'igiene degli animali destinati alla macellazione. Le norme e principi di base stabiliscono che gli animali non devono essere condotti al macello quando il grado di contaminazione delle loro superfici

esterne rischi di compromettere l'igiene della macellazione, qualora prima di tali fasi non sia possibile effettuare idonei interventi di lavaggio e rasatura (Codex Alimentarius Commission, 2005). Tale disposizione è stata riproposta dai Regolamenti del "pacchetto igiene", in cui la responsabilità relativa all'igiene degli animali è stata distribuita tra i vari componenti della filiera delle carni fresche. Il Regolamento (CE) n. 853 del 2004, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene degli alimenti di origine animale, pone l'obbligo da parte degli operatori del settore alimentare che gestiscono macelli di conformarsi ad una serie di requisiti fra i quali quello secondo il quale *"gli animali devono essere puliti"* (cfr. All. III, Sez. I, Cap. IV, p.4). Nel piano di autocontrollo devono essere definite delle procedure che garantiscano che ogni animale o, se del caso, ogni lotto di animali ammesso ai locali di macellazione, sia pulito (cfr. All. II, p 2 1 d). E' altresì compito del Veterinario Ufficiale verificare che gli animali la cui pelle o vello siano in condizioni tali da presentare un rischio inaccettabile di contaminazione delle carni durante la macellazione, non vengano macellati ai fini del consumo umano, a meno che non siano preventivamente puliti (Regolamento (CE) n. 854 del 2004).

La pelle in generale e la pelle ricoperta di escrementi in particolare, sono una fonte di contaminazione della carcassa durante le attività di macellazione.

Gli animali che giungono al macello non possono essere completamente puliti, tuttavia è possibile limitare, quanto più possibile, animali le cui condizioni igieniche della cute possano determinare un elevato rischio di contaminazione durante le successive attività di macellazione.

La popolazione batterica che si ritrova sulla cute dei bovini può derivare dal suolo, dall'acqua, dalla vegetazione e delle feci e vi possono essere rappresentate specie patogene per l'uomo quali *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella*.

I batteri possono essere trasferiti durante il processo di macellazione dalla cute alla carcassa attraverso contatto diretto o indirettamente attraverso le mani degli operatori, i vestiti, gli utensili e i macchinari, andando così a costituire un rischio notevole per la salute del consumatore.

Le autorità sanitarie di Paesi extraeuropei quali l'Australia, la Nuova Zelanda e Stati Uniti, hanno da tempo adottato una politica per la sicurezza della produzione della carne, che considera l'igiene degli animali presentati al macello come punto fondamentale per una corretta gestione igienica delle operazioni di macellazione. L'Australian Meat Safety Enhancement Program ha promosso numerosi programmi di formazione rivolti ai produttori di bovini, sull'importanza della pulizia degli animali negli allevamenti. In alcuni paesi della UE quali la Francia, Belgio e Regno Unito, sono stati definiti dei criteri di valutazione dell'igiene degli animali che, se eccessivamente sporchi, vengono esclusi dalla macellazione. In questi paesi sono state predisposte linee guida, destinate agli operatori e in alcuni casi ai veterinari ispettori, intese a promuovere l'applicazione di metodologie e protocolli di valutazione oggettiva dello stato di pulizia della cute degli animali al macello, quale mezzo per il controllo delle contaminazioni microbiche. Vengono inoltre proposte le azioni preventive a livello di allevamento per assicurare idonee caratteristiche di pulizia degli animali alla macellazione.

**Raffaella Riu, Valutazione dell'igiene degli animali al macello e procedure di decontaminazione delle carni per minimizzare il rischio microbiologico**

**Dottorato di Ricerca in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale  
Università degli Studi di Sassari**

Di seguito vengono illustrati i principali piani di intervento attuati da Paesi, quali la Gran Bretagna, Irlanda, Belgio e Francia.

Il The Meat Hygiene Service (MHS, UK), dal 1995, ha perseguito una politica per la sicurezza denominata “Clean Livestock Strategy”, con lo scopo di impedire ai veterinari e ai responsabili degli stabilimenti di produzione, la macellazione di qualsiasi animale che fosse considerato “troppo sporco da mettere in pericolo le misure igieniche adottate durante il normale processo di macellazione” (Meat Hygiene Enforcement Report, 1997). Nel 1997, furono proposte delle nuove linee guida, supportate da schede illustrative che definivano il grado di igiene dei soggetti sulla base di 5 categorie/livelli di contaminazione della cute (Tabella n. 4 MHS, 1997), stabilendo per ogni categoria se fosse consentita la macellazione ordinaria o se fossero necessarie delle condizioni di macellazione speciali (Meat Hygiene Enforcement Report, 1997).

Tabella n. 4 - Categorie di pulizia proposte dalla MHS, 1997.

Category	Criteria	Action
<b>1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dry</li> <li>- Clean (with regard to faeces and dirt)</li> <li>- Very minor amount of loosely adherent straw or bedding</li> </ul>	Process normal
<b>2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dry/damp</li> <li>- Light contamination with dirt o faeces</li> <li>- Small amounts of loosely adherent straw or bedding</li> </ul>	Process normal
<b>3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dry/damp</li> <li>- Significant contamination with dirt and faeces and/or</li> </ul>	Process only under exceptional circumstances and under special condition

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Significant amounts of adherent straw or bedding</li> </ul>	
<b>4</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dry/damp</li> <li>- Heavy contamination with dirt or faeces</li> <li>- Heavily clogged (hair or equivalent knotted with contamination of dirt or faeces) and/or</li> <li>- Significant amounts or adherent straw or bedding</li> </ul>	Process only under exceptional circumstances and under special condition
<b>5</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Very wet</li> <li>- Very heavily contaminated with dirt or faeces and/or</li> <li>- Very heavily clogged and or</li> <li>- Much bedding adherent to coat</li> </ul>	Reject for slaughter

Nei Regolamenti Governativi Irlandesi, la valutazione del livello di pulizia degli animali presentati al macello, fu introdotta dal “Department of Agriculture and Food” nel febbraio 1998, questi regolamenti individuavano 5 differenti categorie di pulizia degli animali presentati al macello (da 1= pulito a 5 = molto sporco). Le 5 categorie prese in considerazione risultavano molto simili a quelle proposte l’anno precedente dalla British Meat Hygiene Service – Clean Livestock Policy (1997). I soggetti appartenenti alle categorie da 1 a 4 venivano accettati direttamente per la macellazione, mentre i soggetti classificati nella categoria 5 non dovevano essere macellati. Secondo il documento, nel caso in cui i soggetti appartenenti alla categoria 4, presentassero elevati livelli di sporcizia in particolari siti anatomici detti “Primary sites for cleanliness measurements” (es. addome, petto, punto di jugolazione etc.), dovevano essere

adottate delle specifiche procedure di lavorazione utili ad impedire le contaminazioni (Fallon and Lenehan, 1997). Allo stesso tempo, il The Abattoirs Act, 1988 (Veterinary Examination) (Amendment), 1998 (S.I. No. 6, 1998) impediva al veterinario ispettore la macellazione degli animali che presentassero condizioni igieniche della cute potenzialmente in grado di causare delle contaminazioni durante le attività di macellazione, indicando speciali condizioni di lavorazione (rallentamento della catena di macellazione, aumentare lo spazio tra gli animali etc.) da seguire nel caso in cui ci fosse un pericolo di contaminazione durante il processo (McEvoy *et al.*, 2000a).

Nel 2002 la Food Standards Agency (FSA) inglese ha elaborato dei documenti illustrativi per allevatori, veterinari e altri operatori della filiera delle carni. Questi opuscoli informativi, di cui alcuni ristampati nel 2004, hanno lo scopo di sensibilizzare gli allevatori sull'importanza che possa rivestire dal punto di vista sanitario ed economico, la produzione di animali dalle condizioni igieniche della cute adeguate alla macellazione.

Nell'anno 2004 (FSA, 2004a) viene ristampato, un documento della FSA "Red Meat Safety & Clean Livestock", indirizzato ai produttori e ai responsabili del macello. Nel documento vengono illustrati quali siano i pericoli microbiologici connessi alla produzione delle carni rosse, descrivendo i vari microrganismi implicati nelle contaminazioni e le eventuali fonti di contaminazione. Nello stesso documento vengono illustrate le ripercussioni economiche delle "non-conformità" dovute all'avvio al macello di animali appartenenti alle categorie comprese tra 3 e 5 (es. riduzione del valore delle carcasse, distruzione soggetti di cui si impedisce la macellazione etc.) e allo

**Raffaella Riu, Valutazione dell'igiene degli animali al macello e procedure di decontaminazione delle carni per minimizzare il rischio microbiologico**

**Dottorato di Ricerca in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale  
Università degli Studi di Sassari**

stesso tempo viene chiaramente indicato come i costi aggiuntivi dovuti all'attuazione di tali misure straordinarie siano a carico dell'allevatore che ha condotto allo stabilimento animali non idonei alla macellazione (Read Meat Safety & Clean Livestock – Economic implication of compliance e non-compliance. FSA, 2004a). In anticipo rispetto agli altri Paesi Europei e in accordo con le indicazioni della MHS del 1997, un allegato al documento (FSA, 2004a) offre, inoltre, una guida illustrativa alla valutazione dello stato di pulizia degli animali, presentando un sistema per la valutazione dello stato di pulizia degli ovini (Appendix 1: Cleanliness Classification of livestock. FSA, 2004a).

Nello stesso anno (2004b) un documento della FSA, "Clean Beef cattle for slaughter – A guide for producers", dedicato agli allevatori, prende in considerazione tutti i fattori che possono influenzare, a livello di allevamento e trasporto, il grado di pulizia degli animali (stato sanitario, stabulazione, tipo di lettiera, dieta). Il documento offre, inoltre, all'allevatore una pratica guida alla valutazione del grado di pulizia dei propri animali. Nel documento vengono presi in considerazione 5 livelli di pulizia dei soggetti (sulla base di quelli stabiliti dal The Meat Hygiene Service), indicando per ogni categoria di pulizia se il soggetto sia adatto alla macellazione oppure sia necessario adottare degli accorgimenti prima di tale operazione. In base alla griglia di valutazione presentata nel documento FSA, è consentita la macellazione "ordinaria" (cioè senza particolari precauzioni) solo dei soggetti classificati nelle categorie 1 e 2; per i soggetti appartenenti alle categorie 3 e 4 sono previste particolari misure igieniche aggiuntive (ripulitura cute soggetti, rallentamento della linea, maggiore separazione tra i soggetti

vicini, macellazione alla fine della giornata, etc.). Come nel precedente documento del MHS, i soggetti appartenenti alla categoria 5 non possono essere macellati.

Il documento della FSA (2004b) si preoccupa, inoltre, di fornire delle indicazioni pratiche su come preparare i soggetti alla macellazione (es. utilizzo di diete fibrose nel periodo immediatamente precedente la macellazione, lettieri pulite, tosatura dei soggetti con cute eccessivamente imbrattata etc.), asserendo nel contempo, che “gli allevatori devono assicurare che i bovini avviati al macello ricadano all’interno di una delle due categorie di accettabilità stabilite dalla Meat Hygiene Service (MHS)” (FSA, Appendix 5 – Preparing cattle for slaughter - FSA,2004b).

L’Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire Belga (AFSCA, Bruxelles) nel corso del 2006, ha stilato delle linee guida per allevatori, veterinari e responsabili dei macelli, riguardo all’importanza del grado di pulizia della cute degli animali quale fonte di contaminazione per le carni. La guida dell’AFSCA – “Bon Etat des Toison pour des Viandes Sures” (2006), si propone di sensibilizzare i produttori di animali destinati alla macellazione sull’importanza dello stato di pulizia dei propri animali, affermando che: “la pelle degli animali in generale, e in particolare quella ricoperta di escrementi, rappresenta una fonte di contaminazione delle carcasse al momento della macellazione” (AFSCA, 2006). Come nelle linee guida proposte dalla FSA, vengono indicate misure preventive da adottare a livello di allevamento: sanità degli animali (controllo parassiti intestinali causa di diarrea, isolamento dei soggetti malati etc.); l’alimentazione (razioni equilibrate, libero accesso ad alimenti ricchi in fibre, evitare l’ingestione eccessiva di minerali etc.); stabulazione (spazio a sufficienza per ciascun

**Raffaella Riu, Valutazione dell’igiene degli animali al macello e procedure di decontaminazione delle carni per minimizzare il rischio microbiologico**

**Dottorato di Ricerca in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale  
Università degli Studi di Sassari**

animale, lettiere pulite etc.); pulizia degli animali (lavare e asciugare i soggetti sporchi, installare sistemi per la pulizia degli animali come spazzole, rasare le zone di cute che presentano una sporcizia eccessiva etc.)

Da tempo esperti dell'Institut de l'Élevage si sono occupati di valutare se fosse possibile elaborare un sistema di valutazione visiva degli animali da utilizzare come stima della carica microbica della loro cute (Cartier, 1994).

A tale scopo fu elaborata da esperti dell'istituto una griglia di valutazione che prendesse in considerazione 5 livelli di imbrattamento di porzioni di cute (Cartier, 1994):

- nota 0: porzione di cute pressoché libera da impurità;
- nota 1: esiste qualche piccolo cenno di sporcizia;
- nota 2: le impurità sono estese ma occupano meno del 50% della superficie della porzione di cute;
- nota 3: le impurità sono estese e occupano più del 50% della porzione di cute;
- nota 4: la porzione di cute è completamente ricoperta di sporcizia.

Furono successivamente individuate 5 zone del corpo dell'animale su cui effettuare la valutazione (coscia compreso il garretto, zampe anteriori, ventre inclusa la mammella, il fianco, le natiche compresa la coda). Il risultato finale scaturiva dalla media delle note di valutazione ottenuta per ciascuna parte del corpo considerata (Cartier, 1994).

L'Institut de L'Élevage, a seguito del crescente interesse dimostrato dal Governo francese per la pulizia dei bovini avviati al macello, quale strumento per il controllo delle contaminazioni nella filiera delle carni, ha elaborato nel corso degli ultimi anni dei documenti informativi indirizzati agli allevatori, responsabili degli stabilimenti di macellazione e organi deputati al controllo (Institut de L'Élevage, 2005; 2006; 2007).

Nel 2005, sotto la spinta dei rappresentanti delle associazioni di categoria coinvolte nella filiera delle carni e delle pelli, fu stilato il documento "Etat de Lieux de la propreté des bovins à l'entrée de l'abattor" (Institut de L'Élevage, 2005). Scopo principale del documento era la valutazione empirica dello stato di pulizia della cute dei bovini presentati al macello in Francia, nel periodo compreso tra il 2004 e l'inizio del 2005. La griglia di valutazione era formulata in maniera tale da prendere in considerazione 4 classi di pulizia: 1 - pulita; 2 - qualche traccia di sporcizia; 3 - sporca, con qualche traccia di sporcizia aderente; 4 - molto sporca, diffuse placche di sporcizia aderenti alla cute. Per l'esame della sporcizia sono stati presi in considerazione 2 zone dell'animale: la coscia e il ventre.

Nella seconda parte dello stesso documento, come per i documenti redatti dalla FSA, vennero poi presi in considerazione i fattori in grado di influenzare lo stato di pulizia degli animali nell'allevamento e le eventuali misure preventive da adottare per raggiungere l'obiettivo di ottenere animali che giungano al macello in adeguate condizioni igieniche.

Nel 2006 la Direction Générale de l'Alimentation Francese (DGAL), per rispondere alle nuove disposizioni richieste del "Pacchetto Igiene" sull'igiene degli animali al macello e in accordo con le parti della filiera delle carni bovine, ha demandato all'Institut de l'Élevage l'elaborazione di una nuova griglia di valutazione di facile utilizzo per la valutazione della pulizia dei bovini in vivo.

Il documento denominato "Grille de natation de la propreté des bovins vivants" (Institut de l'Élevage, 2006), indirizzato alla valutazione dei bovini vivi, può applicarsi nelle fasi di allevamento, trasporto e stalla di sosta al macello. Il documento francese prende in considerazione 4 classi di pulizia: classe A, pulito; classe B: poco sporco; classe C: sporco; classe D: molto sporco. Le classi sono assegnate sulla base di una valutazione effettuata sull'animale sotto due prospettive, una posteriore, che prende in considerazione: le zampe posteriori, la coscia e le natiche; una di profilo che prende in considerazione: coscia, ventre, sterno e zampe anteriori), (Institut de l'Élevage, 2006). La griglia di valutazione è concepita per valutare lo stato di pulizia dei bovini adulti e prende in considerazione solo il sudiciume secco.

Come già avvenuto negli altri paesi, nel 2007 Institut de l'Élevage, ha pubblicato un nuovo documento indirizzato agli allevatori "Propreté des cuis de bovins – Identification des principaux facteurs d'élevage en relation avec la propreté" (Institut de l'Élevage, 2007), che prende in considerazione tutti i fattori che a livello di allevamento sono in grado di influenzare lo stato di contaminazione della cute degli animali, proponendo nello stesso tempo l'applicazione di misure di controllo delle contaminazioni.

Nella legislazione Italia il tema della pulizia della cute degli animali quale possibile fonte di contaminazione delle carni è stata introdotta di recente con l'introduzione del "Pacchetto Igiene". Non esiste, infatti, nessun riferimento a riguardo nella precedente normativa sull'igiene della macellazione (D.Lvo 286/94). Non sono stati a tuttora proposti metodi di valutazione dello stato di pulizia degli animali presentati al macello, né tantomeno sono state predisposte linee guida illustrative da indirizzare agli allevatori per sensibilizzarli riguardo l'importanza della cute come fonte di contaminazione delle carni. Mancando inoltre una chiara distribuzione delle responsabilità tra le parti interessate nella filiera (allevatori, trasportatori, responsabili dei macelli), riguardo l'applicazione delle prescrizioni introdotte con l'entrata in vigore della nuova legislazione in campo alimentare.

**Food Standard Agency – Red Meat Safety & Clean Livestock (2004). Appendix 1: Cleanliness Classification of Livestock.**

## **Appendix 1: Cleanliness classification of livestock** *(Source: Meat Hygiene Service, 1997)*

### Category 1 - Clean and dry



*Cattle in this category will be accepted for slaughter without any special treatment.*

**Dry**  
Clean with regard to dung/dirt  
Very minor amounts of loosely adherent straw/bedding



*Sheep in this category will be accepted for slaughter without any special treatment.*

**Dry**  
Clean with regard to dirt/dung  
Very minor amounts of loosely adherent straw/bedding

## Category 2 - Slightly Dirty



*Cattle in this category will be accepted for slaughter without any special treatment.*

Dry/damp  
Light contamination with dirt/dung  
Small amounts of loosely adherent straw/bedding



*Sheep in this category will be accepted for slaughter without any special treatment.*

Dry/damp  
Light contamination with dirt/dung  
Small amounts of loosely adherent straw/bedding

### Category 3 - Dirty



Cattle in this category will be rejected for slaughter except in circumstances which are exceptional, e.g. animal welfare grounds, disease control reasons.

Dry/damp  
Significant contamination with dirt/dung and/or Significant amounts of adherent straw/bedding



Sheep in this category will be rejected for slaughter except in circumstances which are exceptional, e.g. animal welfare grounds, disease control reasons.

Dry/damp  
Significant contamination with dirt/dung and/or Significant amounts of adherent straw/bedding

## Category 4 - Very Dirty



Cattle in this category will be rejected for slaughter except in circumstances which are exceptional, e.g. animal welfare grounds, disease control reasons.

Dry/damp  
Heavily contaminated with dirt/dung  
Heavily clagged (clegged) and/or  
Significant amounts of adherent bedding



Sheep in this category will be rejected for slaughter except in circumstances which are exceptional, e.g. animal welfare grounds, disease control reasons.

Dry/damp  
Heavily contaminated with dirt/dung  
Heavily clagged (clegged) and/or  
Significant amounts of adherent bedding

## Category 5 - Filthy and Wet



Cattle in this category will be rejected for slaughter.

Very wet  
Very heavily contaminated with dirt/dung and/or  
Very heavily clogged (clegged) and/or  
A lot of bedding adherent to the coat

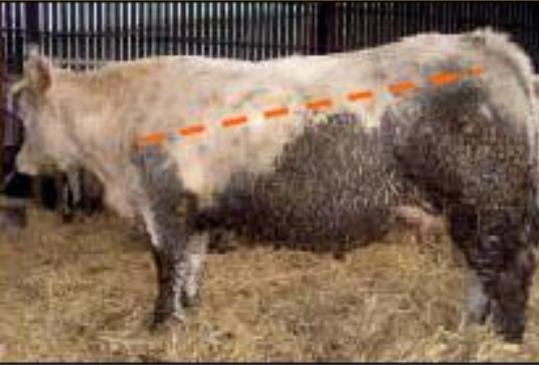


Sheep in this category will be rejected for slaughter.

Very wet  
Very heavily contaminated with dirt/dung and/or  
Very heavily clogged (clegged) and/or  
A lot of bedding adherent to the coat

*Note: Contamination of the following critical areas is particularly likely to result in rejection for slaughter of the animal:- brisket, abdomen (underside), flank, ribcage (lower areas and underside), hind legs (posterior surface of the hock), fore legs (anterior surface of the knee), neck and rectal area.*

Grille de notation de la propreté des bovins vivants - Institut de l'Élevage - 2006

Classes de propreté	Sites d'observation	
	sur le flanc	sur l'arrière
<p><b>A : « propre »</b></p> <p>Absence de salissures sur l'animal ou salissures à l'état de traces</p>		
<p><b>B : « peu sale »</b></p> <p>Zones de salissures s'étendant sur la moitié inférieure de la cuisse et sur le bas du ventre et du sternum</p>		
<p><b>C : « sale »</b></p> <p>Zones de salissures s'étendant du haut de la cuisse (trochanter) jusqu'à l'avant du sternum</p>		
<p><b>D : « très sale »</b></p> <p>Zones de salissures s'étendant de la fesse (hanche) jusqu'à la pointe de l'épaule. Les salissures remontent sur le côté jusqu'en haut du flanc et forment une croûte épaisse.</p>		

## METODI DI DECONTAMINAZIONE DI CUTE E CARCASSE

Ormai da anni l'industria delle carni di Paesi come Stati Uniti, Sud America, Australia e Nuova Zelanda, hanno messo appunto delle metodiche di contaminazione capaci di intervenire su più punti della linea di macellazione (decontaminazione della cute prima e/o della carcassa poi), da attuare per limitare quanto più possibile, l'eventuale moltiplicazione di microrganismi nelle carni e, soprattutto nel caso della decontaminazione della cute, per "prevenire" l'ingresso nella catena produttiva di eventuali microrganismi patogeni.

Le tecniche di decontaminazione delle carcasse sono studiate per ridurre o eliminare sia i batteri patogeni responsabili di tossinfezioni alimentari, sia i batteri alteranti in grado di provocare uno scadimento delle caratteristiche qualitative del prodotto (Huffman, 2002). Tra i batteri in grado di provocare deperimento del prodotto, con differenziazione nella presenza delle specie in relazione alle tecniche di confezionamento adottate, si annoverano *Pseudomonas*, *Actinobacter*, *Aeromonas*, *Alteromonas putrefaciens*, *Lactobacillus*, e *Brochothrix thermosphacta*. Tra i patogeni i più rappresentati sono *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* e *Bacillus cereus* (Huffman, 2002).

Le modalità con cui gli animali vengono macellati influenza notevolmente la qualità finale delle carni da essi derivate. Le manualità effettuate dagli operatori del macello e

la formazione degli stessi influisce sul risultato finale in termini di caratteristiche igienico-sanitarie e qualità del prodotto.

Dati recenti hanno dimostrato una correlazione significativa tra il livello di contaminazione della cute degli animali e la contaminazione delle carcasse da essi derivate (Arthur *et al.*, 2004). Nou *et al.*, (2003) dimostrarono che l'uso di agenti chimici quali decontaminanti della cute ad inizio del processo di macellazione, portasse ad una significativa riduzione nella prevalenza di *Escherichia coli* O157:H7 sulla stessa cute e poi sulle carcasse. Allo stesso modo Bosilevac (2005a), dimostrò l'effettiva riduzione della prevalenza del batterio sulla superficie di carcasse provenienti da soggetti la cui cute era stata preventivamente ripulita tramite lavaggio con l'ausilio di decontaminanti chimici.

La cute umida sarebbe in grado di trasferire il 20% della sua carica microbica sulle carcasse durante il processo di rimozione delle pelli.

Per contro alcuni studi precedenti effettuati da Byrne *et al.* (2000), non avevano comunque evidenziato significative differenze tra carcasse provenienti da soggetti con la cute umida e soggetti con la cute asciutta.

I processi di macellazione mirano alla fabbricazione di prodotti con bassissimi livelli di germi sulle superfici e assenza di germi patogeni; nonostante questo, essendo il processo di lavorazione condotto su un ambiente non sterile, le contaminazioni restano comunque inevitabili. Per il controllo di queste contaminazioni, soprattutto nei paesi USA così come in Australia, sono state sviluppate delle tecniche di

**Raffaella Riu, Valutazione dell'igiene degli animali al macello e procedure di decontaminazione delle carni per minimizzare il rischio microbiologico**

**Dottorato di Ricerca in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale  
Università degli Studi di Sassari**

decontaminazione delle carcasse da abbinare alla normale routine di macellazione. Le attività di base, quali igienica rimozione della cute ed eliminazione rapida delle pelli dai locali di macellazione, sono state combinate con una serie di tecnologie, di natura chimica e fisica, allo scopo di ridurre la contaminazione batterica sul prodotto a fine linea di macellazione. L'efficacia di questo tipo di tecnologia è stata ampiamente indagata, e studi sperimentali hanno dimostrato l'efficacia di queste attività durante i processi di macellazione (Bacon *et al.*, 2000).

Nei Paesi extraeuropei sono numerosi i metodi utilizzati per la decontaminazione della cute e delle carcasse. Queste metodiche, spesso in abbinamento tra loro, prevedono l'eliminazione delle contaminazioni sia attraverso ausili di tipo fisico, che consentono una rimozione meccanica dello sporco e delle contaminazioni, sia attraverso varie sostanze chimiche che esplicano la loro attività a contatto con le superfici carnee.

Schematicamente gli interventi di decontaminazione che vengono effettuati lungo la catena produttiva possono essere così riassunti:

A) Prima della rimozione della cute:

- asportazione dello sporco "visibile" tramite mezzi fisici o acqua;
- docciatura con sostanze chimiche.

B) Dopo la rimozione della cute:

- rifilatura con coltello;
- lavaggio/sprayzzazione/risciacquo:

- acqua calda/fredda;
- sostanze chimiche.
- vapore sottopressione;
- refrigerazione;

C) Sistemi che combinano due o più interventi lungo la linea produttiva.

Attualmente in Italia così come nel resto dei paesi appartenenti alla UE, non è consentito l'utilizzo di sostanze chimiche per la disinfezione delle carcasse. Nei restanti Paesi, numerosi sono i metodi di decontaminazione utilizzati durante i processi di lavorazione delle carni.

Generalmente le condizioni create dai metodi di decontaminazione, consentono una riduzione complessiva del tenore in germi rispetto alla carica batterica totale e ai coliformi totali, fornendo però solo un'indicazione sulla reale diminuzione della concentrazione in germi patogeni (Huffman, 2002).

Numerosi sono i sistemi di decontaminazione approvati dalla FSIS per la decontaminazione delle carcasse: acidi organici, perossido di idrogeno, fosfato trisodico, ozono, lavaggio spray con acqua, pastorizzazione etc.. Molti degli agenti antimicrobici utilizzati hanno dimostrato avere un'efficacia nella riduzione della carica batterica compresa tra 1 a 3-log (Ransom *et al.*, 2003). Tutti questi sistemi di decontaminazione presentano maggiore efficacia quando vengono utilizzati in combinazione tra loro (Edwards and Fung, 2006).

Sono molteplici i fattori capaci di influenzare l'efficacia di suddetti trattamenti. La pressione dell'acqua, la temperatura, il tipo e la concentrazione del prodotto utilizzato, il tempo di esposizione, il metodo di applicazione, la struttura del macello e naturalmente le attività degli operatori, possono modificare notevolmente il risultato finale e dunque l'entità della decontaminazione (Belk *et al.*, 2001). Fattore molto importante capace di influenzare l'efficacia del trattamento decontaminante, è la capacità dei batteri a creare una resistenza alle molecole utilizzate anche attraverso la formazione di biofilm (Stopforth *et al.*, 2003).

La migliore efficacia di decontaminazione si ottiene quando il trattamento viene applicato al termine del processo di macellazione, prima del raffreddamento delle carcasse (Edwards and Fung, 2006).

Nuovi metodi di decontaminazione sono attualmente investigati al fine di assicurare una più efficace eliminazione degli agenti patogeni. Alcuni di questi composti "innovativi" sono la lattoferrina bovina (Lactoferricin B), il cloro acidificato, il cloruro di sodio acidificato, l'acido perossiacetico.

Oggigiorno i metodi più utilizzati nell'industria di macellazione per la decontaminazione delle carni sono: pastorizzazione con acqua calda e l'ausilio di acidi organici, la combinazione vapore/acqua e vuoto; da abbinare alla tolettatura delle parti contaminate (Edwards and Fung, 2006).

Di seguito vengono illustrati i principali metodi di decontaminazione di cute e carcasse.

## DECONTAMINAZIONE DELLA CUTE

I metodi di decontaminazione della cute come linea di principio mirano a limitare, per quanto possibile, le contaminazioni delle carcasse derivate dallo scuoiamento degli animali.

I sistemi di lavaggio più diffusi in genere prevedono l'utilizzo di impianti automatici di docciatura all'inizio della linea di macellazione. Le sostanze utilizzate per queste operazioni variano dall'uso di sola acqua potabile a differenti gradazioni di temperatura, all'impiego di sostanze chimiche quali acidi organici e cloro.

Alcuni paesi come la Nuova Zelanda, hanno adottato la pratica di lavare gli animali prima delle operazioni di macellazione, come politica per la sicurezza delle carni (Mies *et al.*, 2004). In genere si tratta di sistemi automatici che mirano principalmente all'eliminazione dello sporco visibile, quale per esempio quello di derivazione fecale.

In base a numerosi studi, la decontaminazione della cute prima dell'eviscerazione, ha dimostrato avere attività positiva sulla riduzione della prevalenza di microrganismi patogeni nelle carcasse (Barkocy-Gallagher *et al.*, 2003; Nou *et al.*, 2003; Arthur *et al.*, 2004; Bosilevac *et al.*, 2004a).

I dati riportati da Bosilevac *et al.* (2005a), formarono le basi per l'applicazione di sistemi di lavaggio della cute in tutti gli impianti di un importante industria di lavorazione delle carni canadese (Cargill Meat Solucion); tali l'interventi sulla cute

furono considerati fondamentali per ridurre la presenza di patogeni lungo le fasi successive della linea produttiva.

Per contro Mies *et al.* (2004), non notarono nessuna efficacia significativa dei vari interventi di decontaminazione, applicati alla cute agli animali prima della macellazione, sull'incidenza di microrganismi patogeni nelle carcasse a fine lavorazione. I dati di Mies *et al.* (2004), non riscontrarono nessun vantaggio dall'utilizzo di lavaggi della cute con acqua e acido lattico, ma evidenziarono addirittura un incremento nella conta batterica aerobica, coliformi e *E. coli* (da 0.1 a 0.8 log CFU/cm<sup>2</sup>). Mies *et al.*, giustificarono i riscontri negativi delle loro indagini con il fatto che, essendo i batteri nella cute generalmente intrappolati nella sporcizia e nei residui di feci e altro materiale, il lavaggio della superficie cutanea sembrerebbe favorire il rilascio di questi microrganismi e quindi una loro redistribuzione sulle superfici cutanee (Mies *et al.*, 2004).

Vediamo di seguito i principali sistemi di decontaminazione della cute utilizzati nelle industrie di macellazione.

### **Docciatura con acqua**

La docciatura con acqua può essere effettuata o sull'animale vivo in stazione (figura n. 2), prima che venga introdotto nello stabilimento di macellazione, o successivamente allo stordimento e iugulazione, quando è appeso. Nell'animale vivo queste operazioni devono essere effettuate tempo prima che il soggetto venga indirizzato alla macellazione, per dare tempo alla cute di asciugarsi.

Figura n. 2 - Docciatura animali nella stalla di sosta.



Secondo molti autori (Byrne *et al.*, 2000; Mies *et al.*, 2004; Carlson *et al.*, 2008), il lavaggio degli animali con sola acqua a temperatura ambiente non sviluppa risultati positivi in termini di riduzione della carica microbica della cute, e l'utilizzo di tale pratica prima dello scuoiamento, oltre a produrre animali visivamente ripuliti, non si traduce in un miglioramento delle condizioni igieniche delle carcasse (Byrne *et al.*, 2000).

In ogni caso nella maggior parte degli impianti di macellazione di Stati Uniti, Sud America, Australia, Nuova Zelanda e si utilizzano sistemi di lavaggio che prevedano l'utilizzo combinato di acqua e vapore, in alcuni casi con l'ausilio di composti chimici.

### **Lavaggio con vapore**

Generalmente le carcasse vengono introdotte in una camera di processazione in cui viene applicato del vuoto utile a favorire la condensazione del vapore ad una temperatura di 100°C. Successivamente al trattamento viene applicato del vapore di raffreddamento alla pressione di 1.2 - 2.0 kPa (McEvoy *et al.*, 2001).

Studi sperimentali di McEvoy *et al.* (2003a) dimostrano una significativa diminuzione del numero di batteri sulla cute di bovino successivamente al trattamento con vapore, con riduzioni della TVC (Total Viable Count), a seguito di cicli di trattamento a 80°C per 20 sec, di 4 log per ciclo. Per contro l'entità del danno sulle qualità del cuoio, riscontrato successivamente al trattamento da alcuni autori, hanno fatto deporre per un parere negativo sull'utilizzo routinario del vapore a tali condizioni per la decontaminazione della cute (McEvoy *et al.*, 2003a).

### **Agenti antimicrobici**

Gli agenti antimicrobici utilizzati per la decontaminazione della cute, comprendono sia composti acidi organici, che sostanze chimiche quali cloro e sodio.

Un recente studio sperimentale condotto da Carlosn *et al.* (2008), si è occupato di valutare il differente potere decontaminante su carica microbica totale, coliformi totali ed *Escherichia coli*, di alcuni composti (acido acetico, acido lattico, idrossido di sodio, e sodio meta silicato), utilizzati abitualmente nella decontaminazione della cute degli animali prima della macellazione (Figura n. 3, sistema di lavaggio automatico della cute con acqua e soluzioni disinfettanti).

In generale tutti gli agenti antimicrobici, se comparati con il controllo, hanno dimostrato la capacità di ridurre in maniera apprezzabile ( $P < 0.05$ ) la conta in *E. coli*; anche se, solo gli acidi acetico e lattico, si sono dimostrati significativamente utili ( $P < 0.05$ ) per ridurre la carica batterica aerobica e i coliformi totali (Carlson *et al.*, 2008). Gli studi di Carlson *et al.*, come già evidenziato da altri autori (Byrne *et al.*, 2000; Huffman, 2002), hanno ribadito nel contempo l'incapacità della sola acqua a basse temperature di ridurre le concentrazioni di *Escherichia coli* O157:H7, favorendone al contrario l'incremento (Carlson *et al.*, 2008).

Figura n.3 - Hide-On Carcass Wash & Sanitizing Assembly



# METODI DI DECONTAMINAZIONE DELLA CARCASSA

## **Vacuuming**

Alla luce della politica della tolleranza zero nei confronti delle contaminazioni fecali delle carni, nel 1996 la FSIS approvò di testare l'uso di vapore sottovuoto quale possibile alternativa al solo utilizzo della tolettatura manuale come strumento di rimozione dello sporco visibile dalle carcasse. Gli studi condotti sull'efficacia di questo metodo indicarono che, le carcasse sottoposte a trattamento presentavano alla fine del processo un indice di contaminazione inferiore allo 0,69 log cfu/cm<sup>2</sup>, rispetto a quelle che erano state semplicemente sottoposte a tolettatura. In seguito a tali risultati l'impiego del vapore sottovuoto è attualmente molto utilizzato nell'industria di macellazione USA, con lo scopo di migliorare la pulizia visibile delle carcasse e ridurre nel contempo le contaminazioni microbiche (Edwards and Fung, 2006).

## **Pastorizzazione col vapore (Steam Pasteurization)**

Il vapore alla temperatura di pastorizzazione possiede la proprietà di uccidere rapidamente i batteri (Kozempel *et al.*, 2003). Il suo utilizzo nell'industria delle carni rosse è approvato negli USA dall'USDA-FSIS già dal 1996, e numerosi sono attualmente i sistemi di decontaminazione in uso che prevedono l'utilizzo combinato di vapore/pressione e vapore/acqua/aspirazione.

Oltreoceano, sistemi combinati di decontaminazione, che prevedono l'utilizzo di vapore sotto pressione, sono routinariamente utilizzati negli impianti di macellazione

di bovini. Il sistema, situato alla fine della catena di macellazione, è interamente automatizzato (Figura n. 4) e prevede il trattamento delle carcasse in 3 tempi (Retzlaff *et al.*, 2004):

1. la superficie delle carcasse è preventivamente asciugata per mezzo di un getto d'aria sottopressione (Questa attività è più che altro necessaria con lo scopo di asciugare le carcasse, che nel processo di macellazione USA vengono spesso sottoposte a docciatura).
2. secondariamente le carcasse vengono esposte a vapore sotto pressione a 105°C per 6 o 8 secondi in una camera totalmente ermetica. La temperatura della superficie delle carcasse a questo livello è portata rapidamente ad una temperatura di 91-94 °C.
3. la terza tappa prevede che la temperatura della carcassa venga rapidamente abbassata a 20 °C tramite l'utilizzo di acqua ghiacciata. Questa ultima fase ha il doppio vantaggio di riportare rapidamente la temperatura delle carcasse ad un livello adatto alla refrigerazione, ma allo stesso tempo, prevenire gli effetti negativi del trattamento termico sulla carne (es. sbiadimento della superficie).

In Europa l'uso del vapore quale mezzo di decontaminazione delle carcasse è stato recentemente oggetto di un avviso dell'AFSSA (2007) sui metodi alternativi alla decontaminazione chimica per la disinfezione delle carcasse. I dati fin ora raccolti indicano che la decontaminazione batterica delle carcasse dopo l'applicazione del trattamento si aggira intorno ad 1 log (flora microbica totale) a seguito di 24 di stoccaggio. Inoltre, la percentuale di carcasse sulle quali era stata dimostrata la

**Raffaella Riu, Valutazione dell'igiene degli animali al macello e procedure di decontaminazione delle carni per minimizzare il rischio microbiologico**

**Dottorato di Ricerca in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale  
Università degli Studi di Sassari**

presenza di *Enterobacteriaceae*, diminuisce dal 46% (pre-trattamento) al 29% nelle 24 ore successive al trattamento (AFSSA, 2007). Poche indagini sono ancora disponibili sulle conseguenze di questo trattamento per periodi di stoccaggio superiori alle 24 ore. Fino ad allora, l'assenza di effetti negativi sull'aspetto delle carcasse, fa ben sperare per l'adozione di questo metodo per la decontaminazione delle carcasse (AFSSA, 2007).

Alcuni autori (Warriner *et al.*, 2001) hanno ipotizzato che il trattamento con vapore potesse aumentare la capacità dei batteri di aderire alla superficie delle carcasse, gli autori sono però giunti alla conclusione che non esistono sostanziali differenze tra carcasse che hanno subito il processo di pastorizzazione e quelle non trattate; così come non esiste neppure una diminuzione della capacità di aderenza dei batteri su carcasse che siano state precedentemente trattate (Warriner *et al.*, 2001).

Figura n. 4 - Hot Water Pasteurization System



## **Raffreddamento Spray (Spray Chilling)**

Il raffreddamento delle carcasse è un efficace mezzo di controllo delle contaminazioni microbiche. Lo Spray Chilling è una pratica accettata in molti stabilimenti di macellazione degli USA, in quanto il raffreddamento tramite evaporazione contribuisce al controllo microbico, diminuendo nel contempo le normali perdite di peso delle carcasse a seguito del raffreddamento (Edwards and Fung, 2006).

La metodica prevede in genere la spruzzazione intermittente delle carcasse con acqua fredda durante le prime 3 - 8h post-mortem; durante questo periodo si ha una perdita di acqua tramite evaporazione consentendo alla superficie della carcassa di restare umida e di ridurre perciò le perdite in peso dovute al raffreddamento (Savell *et al.*, 2005).

L'United States Department of Agriculture, autorizza l'utilizzo di composti acidi quali ad esempio il clorito di sodio e acidi organici, in abbinamento al trattamento spray (Stopforth *et al.*, 2004). L'efficacia sui microrganismi patogeni del trattamento di sprayzzazione abbinato all'ausilio di composti chimici, resta comunque dipendente da vari fattori tra cui: le variazioni di temperatura, il tempo di esposizione e le cross-contaminazioni tra carcasse contigue (Stopforth *et al.*, 2004). Alcune indagini sperimentali sull'efficacia del trattamento di sprayzzazione abbinato all'uso di composti chimici, hanno dimostrato che la migliore attività battericida nei confronti di *Escherichia coli* O157:H7 è stata sviluppata dal trattamento spray in abbinamento al CPC (Cetylpyridium chloride), con riduzioni superiori a 5-log (Stopforth *et al.*, 2004).

L'utilizzo del CPC per la decontaminazione delle carcasse è attualmente in via di approvazione, in quanto i residui del prodotto sulle carni, risultano ancora troppo elevati per autorizzarne il consumo umano (Bosilevac *et al.*, 2004b).

### **Lavaggio spray (Spray Washing)**

Esistono numerose ipotesi sull'efficacia del lavaggio tramite sprayzzazione sulla riduzione delle contaminazioni microbiche delle superfici carnee. I risultati ottenuti possono variare notevolmente a seconda del prodotto utilizzato. Sono stati evidenziati, infatti, sia risultati abbastanza positivi (trattamento con acidi organici), che effetti negativi quali una redistribuzione delle contaminazioni (trattamento con sola acqua) (Edwards and Fung, 2006).

### **Acqua**

La sprayzzazione con acqua potabile non presenta in genere effetti sulla riduzione della contaminazione microbica delle carcasse. Nonostante questo, molta dell'efficacia dipende da vari parametri tra i quali il tempo di contatto, la pressione dell'acqua, la temperatura dell'acqua e il tipo di macchinario utilizzato per l'applicazione (Fung *et al.*, 2001).

Studi effettuati da vari autori (Prasai *et al.*, 1995; Bell,1997; McEvoy *et al.*, 2003b), hanno dimostrato che l'utilizzo dei lavaggi con acqua potabile come mezzo di decontaminazione delle carcasse, non solo non portano a riduzioni significative della

carica microbica, ma possono generare una ridistribuzione delle contaminazioni sulla superficie della carcassa.

Per contro l'acqua calda si dimostra molto più efficace nel ridurre la contaminazione che l'acqua fredda, e il suo impiego è altamente regolato dai Governi dei Paesi che l'utilizzano. Uno studio condotto nel 2003 da Ransom *et al.*, dimostrò che l'utilizzo dell'acqua per il lavaggio delle carcasse a temperatura ambiente non presenta riduzioni significative nella carica microbica. Alla luce di ciò, in paesi come gli Stati Uniti in cui l'utilizzo dell'acqua come metodo decontaminante è autorizzato dall'USDA-FSIS, vengono vivamente raccomandate temperature di lavaggio comprese tra 74 e 85 °C (Figura n. 5, lavaggio delle carcasse a fine processo).

Un avviso l'AFSSA (Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Aliments) relativo ai metodi alternativi alla decontaminazione chimica delle carcasse, ha preso in considerazione la valutazione sull'utilizzo del lavaggio con acqua calda (74°C) per la decontaminazione delle carcasse di bovino. I dati dell'AFSSA dimostrano una diminuzione dei livelli di contaminazione microbica a seguito di lavaggio con acqua calda, dell'ordine di meno 1 log. L'effetto decontaminante resta comunque dipendente dalle condizioni di utilizzo (pressione dell'acqua, tempo di trattamento, mantenimento della temperatura etc.) così come dal momento in cui viene effettuato il trattamento.

Temperature di lavaggio superiori ai 74°C dimostrano maggiore capacità decontaminante con riduzioni dell'ordine di 2-3 unità logaritmiche su carcasse preventivamente inoculate (AFSSA, 2007). Studi condotti con l'utilizzo di temperature

superiori (82 °C sulla superficie delle carcasse), hanno dimostrato una significativa efficacia nella riduzione del numero di microrganismi.

Decolorazioni temporanee delle carni si sono osservate nelle ore successive al trattamento con acqua calda (Edwards and Fung, 2006) e l'utilizzo di temperature più drastiche (superiori a 85°C con tempi di trattamento superiori ai 20 s) sono responsabili della decolorazione permanente delle carni e di uno scadente aspetto delle carcasse.

Figura n. 5 - Lavaggio delle carcasse alla fine del processo.



### **Acidi Organici**

Gli acidi organici sono utilizzati nell'industria delle carni dei Paesi Extraeuropei quale mezzo di decontaminazione durante le operazioni di macellazione (Fang e Tsai, 2003) (Figura n. 6 e 7). Il FSIS approva l'uso di lavaggi con acqua e acidi organici consentiti,

per la decontaminazione delle carcasse prima dell'eviscerazione (Edwards and Fung, 2006).

L'acido acetico e l'acido citrico sono generalmente considerati sicuri dalla FDA (Food and Drug Administration) per numerosi utilizzi. Il trattamento con acidi organici delle carcasse è effettuato in genere in soluzioni acquose tra l'1,5 e il 2,5%.

L'entità della decontaminazione della flora microbica delle carcasse con l'utilizzo di acidi organici si aggira intorno alle 2 log cfu/cm<sup>2</sup> (Fung *et al.*, 2001).

I migliori risultati si sono ottenuti immergendo le matrici organiche nella soluzione di acqua e acido. Tale metodo per immersione resta comunque inapplicabile durante nelle normali attività di macellazione dei ruminanti domestici (Edwards and Fung, 2006).

### Acido acetico

L'acido acetico ha dimostrato un effettivo potere decontaminante sulle carcasse, determinando una riduzione nel numero di microrganismi patogeni. Studi condotti sulla sopravvivenza di microrganismi patogeni trattati con soluzioni di acido acetico, hanno dimostrato che alcuni di essi hanno la capacità di sopravvivere nell'ambiente dopo il trattamento, ma vengono completamente inattivati nel corso del tempo (Samelis *et al.*, 2001). Nonostante alcuni studi precedenti dimostrassero non esistessero significative differenze rispetto a quanto ottenuto dal solo utilizzo del lavaggio con acqua calda (Gorman *et al.*, 1997).

La composizione in grasso delle carcasse ha impatto sull'effetto sanitizzante del composto, in quanto l'effetto decontaminante è maggiore sui tessuti con un minore quantitativo di grassi (Edwards and Fung, 2006).

### Acido lattico

L'acido lattico ha dimostrato avere una buona attività batteriostatica e battericida. Soluzioni di acido lattico vengono utilizzate di routine nella decontaminazione delle carcasse (Kozempel *et al.*, 2003).

Uno studio condotto da Ramson *et al.* (2003), ha dimostrato una significativa riduzione della concentrazione in microrganismi patogeni ( $2,5 \log \text{cfu/cm}^2$ ). La temperatura della soluzione utilizzata riveste, anche in questo caso, un grande influenza sulla riduzione della carica batterica.

Essendo l'acido lattico in particolare, capace di alterare il colore delle carni fresche soprattutto nelle parti di tessuto che presentano macchie di sangue (Crozier-Dodosn, 2000), le concentrazioni utilizzate per la decontaminazione delle carcasse devono restare basse per limitare gli effetti negativi sulla qualità delle carcasse.

### Acido Fumarico

L'acido fumarico è stato per lungo tempo ignorato dall'industria di produzione delle carni, nonostante la sua comprovata efficacia nella riduzione della carica batterica (Edwards and Fung, 2006).

Figura n. 6 - Sistema automatico di decontaminazione delle carcasse tramite acidi organici.

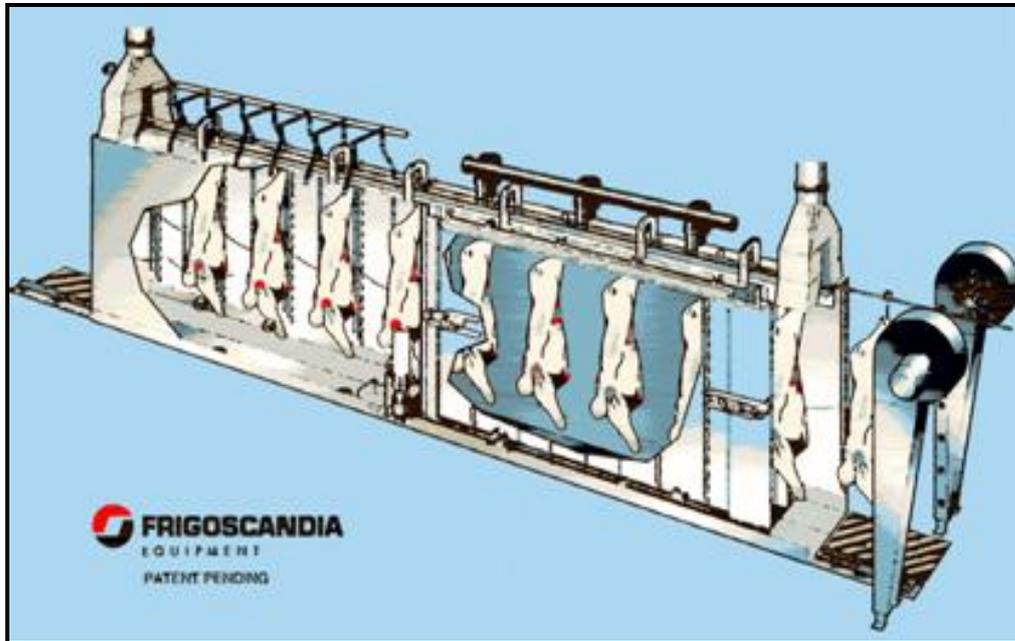


Figura n. 7 - Organic Acid Spray System



Raffaella Riu, Valutazione dell'igiene degli animali al macello e procedure di decontaminazione delle carni per minimizzare il rischio microbiologico  
Dottorato di Ricerca in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale  
Università degli Studi di Sassari

## **Altre sostanze chimiche**

### Cloro

Si tratta di un prodotto poco costoso e utile per controllare le contaminazioni nell'industria delle carni. Il suo utilizzo è però ridotto, in quanto facilmente inattivato nel materiale organico (Bosilevac *et al.*, 2005a). L'entità dei suoi effetti diminuisce notevolmente con le basse temperature (Rice *et al.* 2003) ed è colpito dal pH della soluzione (Fung *et al.*, 2001).

A contatto con gli alimenti, dimostra essere attivo nel ridurre di 2-log cfu/cm<sup>2</sup> i microrganismi presenti nella carcassa (Funf *et al.*, 2001), al contrario di altri autori che indicano l'utilizzo del cloro come uno dei metodi meno efficaci nella decontaminazione delle carcasse (Belk 2001).

Uno studio condotto dalla U.S. Environmental Protection Agency per testare la sensibilità al trattamento con il cloro di 7 diversi ceppi di *Escherichia coli* O157:H7 isolati da capi bovini, ha comunque dimostrato la capacità del cloro di ridurre la presenza del patogeno da un livello iniziale di 5,79 log ufc/mL a <1 log dopo 2 minuti di esposizione delle colture all'agente decontaminante (Rice *et al.*, 2003). Si tratta in ogni caso di risultati sperimentali che, vista l'inattivazione che subisce il cloro nelle matrici organiche, non possono essere facilmente relazionati all'eventuale utilizzo sulle carcasse lungo la linea di macellazione.

### Diossido di cloro

Il diossido di cloro è utilizzato in alcune industrie alimentari per la sterilizzazione dei macchinari e degli ambienti di lavorazione (Haas, 2001).

Il diossido di cloro è più adatto per decontaminazione delle carcasse del cloro semplice, in quanto reagisce in maniera più blanda con i componenti organici delle matrici alimentari (Shin *et al.*, 2004).

Il Code of Federal Regulations (CFR) nel 2005, ha approvato l'utilizzo del diossido di cloro, nella quantità di 3 ppm, quale agente decontaminante per il lavaggio delle carcasse volatili. Nonostante ciò, il suo utilizzo non è ancora consentito sulle carcasse (Shin *et al.*, 2004).

Il diossido di cloro è ampiamente utilizzato nelle regioni asiatiche; in questi paesi trova impiego nell'industria della pesca quale agente decontaminante in abbinamento al trattamento col ghiaccio (Shin *et al.*, 2004).

### Fosfato trisodico

L'utilizzo sulle carcasse del fosfato trisodico è approvato negli USA da tempo; e studi sull'efficacia del composto hanno dimostrato che possiede la capacità di inibire i batteri aderenti alla superficie delle carcasse (Sofos *et al.*, 1999).

Il fosfato trisodico è generalmente applicato sulle carcasse in concentrazioni comprese tra 8 e 12%, con temperatura comprese tra i 32 e i 43 °C. La durata del trattamento non è mai superiore ai 30 s.

La sua applicazione avviene o tramite cabine automatiche o manualmente tramite apparecchiature che prevedono l'utilizzo da parte degli operatori.

La sua efficacia sulla riduzione delle contaminazioni delle carcasse dei volatili è stata da tempo ampiamente dimostrata (Dickison *et al.*, 1994).

#### ASC (Clorito di sodio acidificato)

La FDA ha approvato l'utilizzo del Clorito di sodio nella decontaminazione delle carcasse in combinazione con alcuni acidi organici autorizzati (GRAS status).

La concentrazione del clorito di sodio utilizzato deve essere compresa tra 500 e 1200 ppm e il pH tra 2,5 e 2,9 (CFR, 2005a).

L'attività antibatterica del clorito è dovuta alla formazione in soluzione di ioni che, convertiti in diossido di clorito, hanno la capacità di inibire la sintesi proteica.

Alcuni studi hanno evidenziato la capacità del clorito di sodio di ridurre fino a > 4 log la concentrazione di *Escherichia coli* O157:H7 dopo 14 giorni di stoccaggio (Lim and Mustapha, 2004). Per contro, gli stessi studi hanno evidenziato conseguentemente al trattamento, una diminuzione della colorazione e della consistenza delle carni.

#### **Metodiche alternative**

Raffaella Riu, Valutazione dell'igiene degli animali al macello e procedure di decontaminazione delle carni per minimizzare il rischio microbiologico  
Dottorato di Ricerca in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale  
Università degli Studi di Sassari

## Lattoferrina B

La lattoferrina è una glicoproteina normalmente presente in molte secrezioni dell'organismo quali latte, saliva e lacrime. E' inoltre presente nei granuli secondari dei neutrofili (Shin *et al.*, 1998). La lattoferrina è capace di legarsi alla membrana dei batteri Gram-negativi e causare il rilascio di lipopolissacaridi determinando la rottura del rivestimento cellulare.

Il suo utilizzo nell'industria delle carni sarebbe giustificato da alcuni studi, che indicano la capacità della lattoferrina di prevenire l'ancoraggio dei batteri alle superfici delle carcasse (Naidu, 2000). Per contro altri studi hanno evidenziato la mancanza di un effetto significativo sulla riduzione della popolazione batterica ad opera della lattofettina (Ramsom *et al.*, 2003).

## Irradiazione

Attualmente più di 23 paesi utilizzano l'irradiazione nel processo di produzione delle carni. Negli Stati Uniti l'utilizzo delle radiazioni è autorizzato dalla FDA (1997) e dall'USDA (2000). L'USDA-FSIS autorizza l'utilizzo di delle radiazioni con livelli massimi di 4,5 kGy (KiloGray) per le carni rosse fresche e 7.0 kGy per le carni congelate (CFR 2005c).

I migliori risultati si ottengono irradiando superfici estese ma dello spessore non superiore ai 15 mm (Arthur *et al.*, 2005).

L'utilizzo dell'irradiazione per la decontaminazione diretta delle carcasse, non risulta completamente agevole, in quanto, per consentire l'azione in profondità delle radiazioni, sono richiesti un alto potere di penetrazione e notevole impiego energia (Arthur *et al.*, 2005).

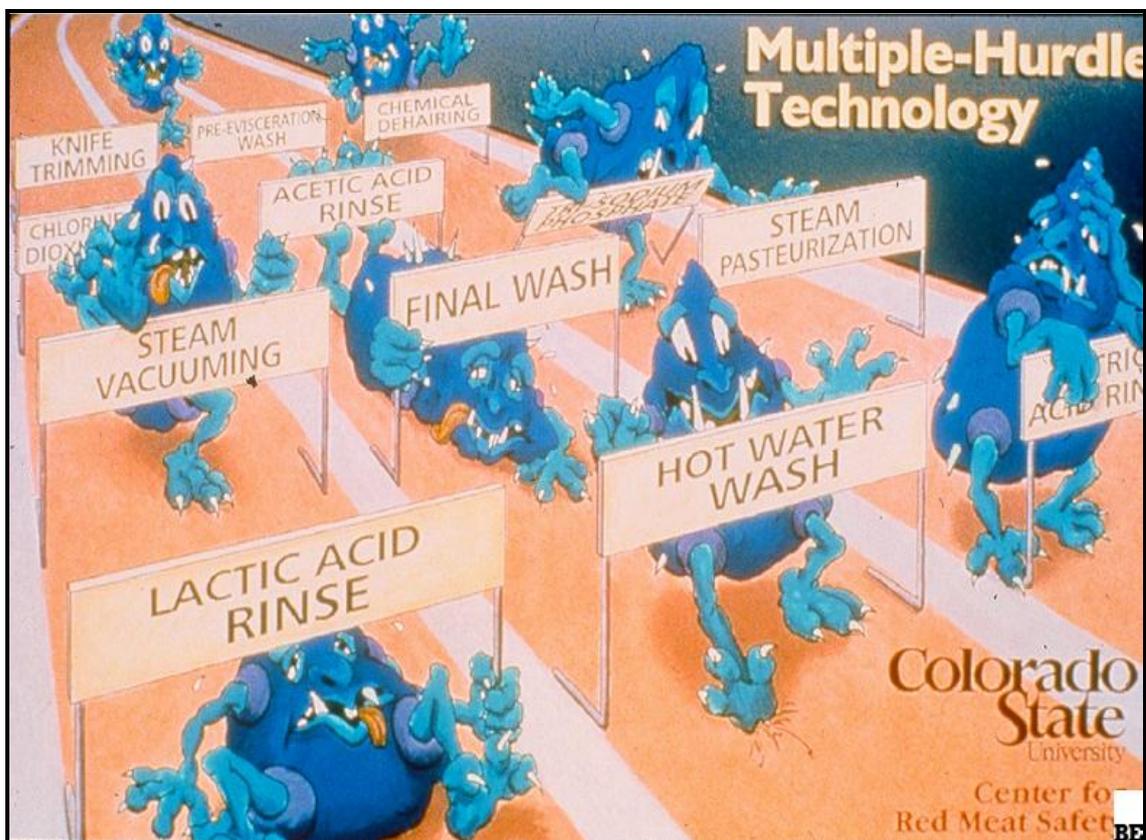
Alcuni ricercatori del MITEC Advanced Technologies, in accordo con le industrie del settore, hanno presentato dei sistemi online di decontaminazione dell'intera carcassa. Questi sistemi sarebbero capaci di sfruttare la capacità di penetrazione delle radiazioni nelle anfrattuosità della superficie carnea, quale mezzo di controllo delle contaminazioni da batteri patogeni (Olsen, 2004).

### **Multiple-Hurdle Technology**

L'utilizzo di due, tre o più processi sulla stessa linea, dimostra avere un effetto sinergico sul potere decontaminante rispetto all'utilizzo di uno solo (Sofos and Smith, 1998). Questo approccio, nei paesi che lo utilizzano, viene comunemente chiamato sistema di decontaminazione ad "ostacoli multipli" (Multiple Hurdle) (Figura n. 8). L'utilizzo di acqua ad elevate temperature, ha ormai da tempo dimostrato avere la capacità di migliorare l'efficacia delle soluzioni di alcuni acidi organici come l'acido lattico (Cutter *et al.*, 1997). Esperienze di Bacon *et al.* (1998), dimostrano che, l'utilizzo combinato sulla linea di macellazione di multipli interventi decontaminanti, risulta effettivamente efficace nel ridurre sia la conta batterica totale che l'incidenza di patogeni quali *Salmonella*. Attualmente, la maggior parte degli impianti USA utilizzano l'impiego di due o più sistemi decontaminanti lungo la linea di macellazione. Tali

sistemi combinati prevedono in genere, un lavaggio della carcassa con soluzioni di acqua e acidi organici prima dell'eviscerazione e un successivo lavaggio delle carcasse alla fine della linea di macellazione.

Figura n. 8 - Multiple-Hurdle Technology. Colorado State University - Center for Red Meat Safety.



# **APPLICAZIONE PRATICA DI UNO STRUMENTO DI VALUTAZIONE DEL GRADO DI PULIZIA DI BOVINI PRESENTATI AL MACELLO**

Nella legislazione Italiana il tema della pulizia della cute degli animali quale possibile fonte di contaminazione delle carni è stata introdotta di recente con l'entrata in vigore del "Pacchetto Igiene". Non esiste, infatti, nessun riferimento a riguardo nella precedente normativa sull'igiene della macellazione (D.Lvo 286/94). Non sono stati a tutt'ora proposti metodi di valutazione dello stato di pulizia degli animali presentati al macello, né tantomeno sono state predisposte linee guida illustrative da indirizzare agli allevatori per sensibilizzarli riguardo l'importanza della cute come probabile fonte di contaminazione delle carni. Manca inoltre una chiara distribuzione delle responsabilità tra le parti interessate nella filiera (allevatori, trasportatori, responsabili dei macelli), riguardo l'applicazione delle prescrizioni introdotte con l'entrata in vigore della nuova legislazione in campo alimentare.

Lo scopo del primo contributo pratico è quello di testare, in uno stabilimento di macellazione, l'applicabilità di un metodo di valutazione del grado di pulizia dei bovini avviati al macello e verificare nel contempo quale sia l'andamento generale delle condizioni igieniche degli stessi.

## **MATERIALI E METODI**

L'indagine è stata svolta, nel corso di un intero anno di macellazione, presso un macello industriale di piccole dimensioni sito nella provincia di Modena. Sono stati classificati tutti i bovini sottoposti a macellazione nel corso del 2007.

Per l'espressione del giudizio sul grado di pulizia della cute dei bovini è stato adottato lo schema di valutazione visiva proposto dalla FSA (Food Standard Agency, 2004), integrato per alcune valutazioni con quello proposto dall'AFSCA (Agence Fédéral pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire, 2006).

### **Parametri di valutazione dei soggetti**

I soggetti sono stati classificati in base all'appartenenza a 5 categorie di pulizia proposte dal documento della FSA (FSA, 2004):

- **1: pulito e asciutto;**
- **2: Leggermente sporco;**
- **3: sporco;**
- **4: molto sporco;**
- **5: sporco e bagnato fradicio.**

Le immagini relative a ciascuna categoria proposta dalla FSA sono di seguito riportate:

**Categoria 1: asciutto e pulito**



*Cattle in this category will be accepted for slaughter without any special treatment.*

Dry  
Clean with regard to dung/dirt  
Very minor amounts of loosely adherent straw/bedding

**Categoria 2: leggermente sporco**



*Cattle in this category will be accepted for slaughter without any special treatment.*

Dry/damp  
Light contamination with dirt/dung  
Small amounts of loosely adherent straw/bedding

### Categoria 3: sporco



Cattle in this category will be rejected for slaughter except in circumstances which are exceptional, e.g. animal welfare grounds, disease control reasons.

Dry/damp  
Significant contamination with dirt/dung and/or Significant amounts of adherent straw/bedding

### Categoria 4: molto sporco



Cattle in this category will be rejected for slaughter except in circumstances which are exceptional, e.g. animal welfare grounds, disease control reasons.

Dry/damp  
Heavily contaminated with dirt/dung  
Heavily clagged (clegged)  
and/or  
Significant amounts of adherent bedding

## Categoria 5: sporco e bagnato fradicio



Per rendere il giudizio il più obiettivo possibile, la categoria di appartenenza è stata attribuita prendendo in considerazione anche le valutazioni proposte dalle linee guida elaborate dall'AFSCA, 2006.

La griglia di valutazione dell'AFSCA prevede la classificazione dei soggetti secondo 3 categorie di pulizia:

- **1 pulito:** da pulito e asciutto a leggermente insudiciato (il soggetto può essere accettato direttamente per la macellazione);
- **2 sporco** (sono necessarie delle misure correttive prima della macellazione);

- **3 molto sporco** (sono necessarie misure correttive estese prima della macellazione).

Di seguito vengono illustrate le 3 categorie di valutazione proposte dall'AFSCA, 2006.

**Categoria 1: pulito e asciutto o leggermente sporco (il soggetto può essere accettato direttamente per la macellazione).**



**Categoria 2: sporco (sono necessarie misure correttive prima della macellazione).**

**CATÉGORIE 2 : sales.**

Des mesures sont nécessaires avant de procéder à l'abattage des animaux.



**Categoria 3: molto sporco (sono necessarie estese misure correttive prima della macellazione).**

**CATÉGORIE 3 : très sales.**

Des mesures étendues sont nécessaires avant de procéder à l'abattage des animaux.

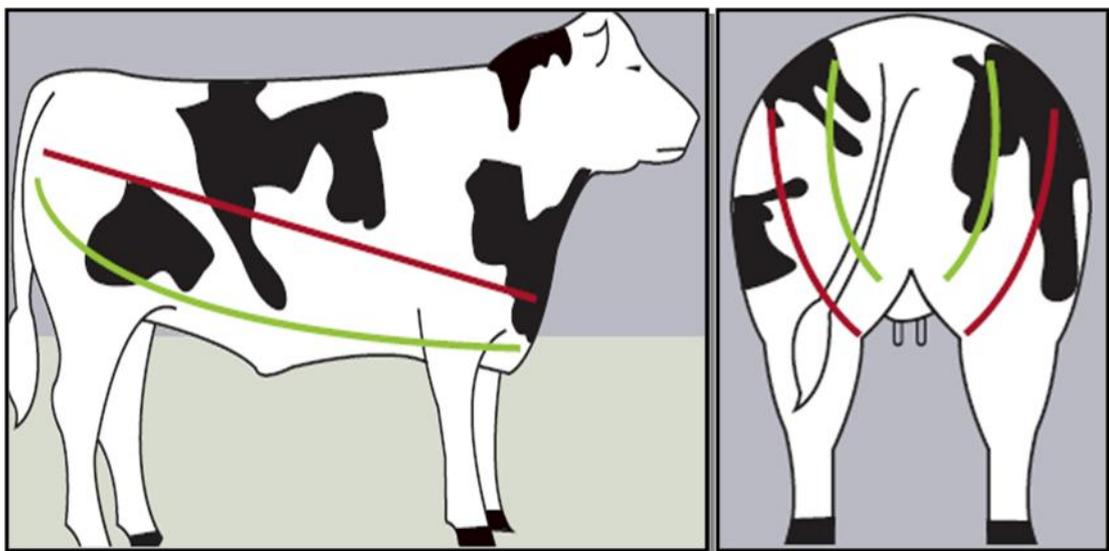


I criteri di valutazione utilizzati dall'AFSCA per assegnare la categoria di pulizia dell'animale sono: la localizzazione del sudiciume, il grado di sporcizia e il livello di umidità della cute.

La localizzazione dello sporco viene eseguita attraverso la valutazione visiva degli animali secondo due prospettive: laterale e posteriore.

Per ogni prospettiva vengono prese in considerazione la proiezione di due linee immaginarie, una verde e una rossa, che attraversano il corpo dell'animale (Vedi figura n.10). A seconda di quanto la sporcizia superi i livelli creati dalle due linee, si definisce la categoria di appartenenza del soggetto (Tabella n. 5).

Figura n.10 - Localizzazione del sudiciume secondo AFSCA, 2006



**Vista laterale**

**Vista posteriore**

Tabella n. 5 – Identificazione categorie AFSCA

La sporcizia non supera la linea verde	<b>Categoria 1</b>
La sporcizia si trova tra la linea verde e quella rossa	<b>Categoria 2</b>
La sporcizia va oltre la linea rossa	<b>Categoria 3</b>

Per la nostra indagine si è deciso di utilizzare entrambi i criteri di valutazione, ma di esprimere il giudizio sulla base delle 5 categorie (da 1 a 5) di pulizia individuate dalla FSA, in quanto consentiva di dettagliare maggiormente il punteggio attribuito a ciascun soggetto. Per permettere l'utilizzo di entrambi i metodi di valutazione, è stata creata una griglia di comparazione del giudizio espresso con il metodo proposto dalla FSA che prevede 5 categorie di pulizia e quello elaborato dalla AFSCA, che invece, prende in considerazione 3 categorie.

Di seguito viene riportata la tabella (Tabella n. 6) di comparazione tra i due sistemi di classificazione.

Tabella n.6 – Comparazione tra metodi di valutazione FSA/AFSCA

<b>FSA (2004)</b>		<b>AFSCA (2006)</b>	
<b>Categoria</b>	<b>Descrizione</b>	<b>Categoria</b>	<b>Descrizione</b>
<b>1</b>	Pulito e asciutto	<b>1</b>	Da pulito e asciutto a leggermente insudiciato
<b>2</b>	Leggermente sporco		
<b>3</b>	Sporco	<b>2</b>	Insudiciato
<b>4</b>	Molto sporco	<b>3</b>	Molto insudiciato
<b>5</b>	Sporco e bagnato fradicio		

Per entrambi i metodi di valutazione (FSA e AFSCA) i tipi di insudiciamento presi in considerazione sono stati quello fresco e quello secco. Il primo è caratteristico dell'animale che si è sporcato "di recente" con materiale fecale proprio e/o di altri soggetti con cui è venuto a contatto durante il trasporto, o con la lettiera del mezzo utilizzato per il trasporto al macello, anch'essa insudiciata o bagnata. Il secondo tipo di insudiciamento è quello riferibile, oltre che allo stato sanitario del soggetto, alle caratteristiche strutturali e gestionali dell'allevamento di provenienza.

Per una definizione più precisa del grado di insudiciamento della cute sono stati utilizzati, inoltre, alcuni parametri proposti dall'AFSCA, 2004 (Agenzia Federale per la Sicurezza della Catena Alimentare):

1. **lo spessore della sporcizia:** strato fine o strato ispessito (agglomerato);
2. **la distribuzione della sporcizia:** sparpagliata o generalizzata;
3. **la presenza o assenza di paglia o altra sporcizia aderente.**

I precedenti parametri sono stati utilizzati secondo i criteri indicati nella seguente tabella (Tabella n. 7).

Tabella n. 7 - Parametri di valutazione dello sporco AFSCA

<b>Parametro valutato</b>	<b>Non aggrava la valutazione</b>	<b>Aggrava la valutazione</b>
Spessore della sporcizia	Strato fine	Strato ispessito/agglomerato
Distribuzione della sporcizia	Sparpagliata	Generalizzata
Paglia e altra sporcizia aderente	Assenza	Presenza

## Valutazione dei soggetti

I soggetti sono stati valutati secondo due prospettive, una laterale e l'altra posteriore. Per ogni prospettiva sono stati presi in considerazione le zone del corpo che, in base ai criteri stabiliti dalla FSA e dall'AFSCA, sono state ritenute più utili ai fini della valutazione (Tabella n. 8)

Tabella n. 8 – Parti del corpo valutate

Prospettiva	Parti del corpo prese in considerazione		
Laterale	Torace	Addome in parte	Bacino e coscia
Posteriore	Ano e coda	Vulva nella femmina	Perineo
<b>N.B. Gli arti vengono valutati in entrambe le prospettive</b>			

In nessuna delle due prospettive è stato preso in considerazione o stato di pulizia del dorso, in quanto, trattandosi di una zona che in genere non entra a contatto con il suolo e le deiezioni, la valutazione è stata considerata ininfluyente per la formulazione del giudizio finale.

Ai fini della valutazione del livello di pulizia dei bovini al macello, l'operatore ha attribuito al soggetto in esame, in stazione, la categoria di appartenenza (da 1 a 5)

relativamente alle sue condizioni igieniche. Prendendo in considerazione prima la prospettiva laterale del soggetto e successivamente quella posteriore.

La categoria di pulizia assegnata al soggetto era poi annotata su una scheda di visita ante-mortem (vedi Scheda allegata). Sulla stessa scheda sono stati registrati l'età e il numero progressivo di macellazione. Questo ha consentito, nella successiva fase di elaborazione dei dati, di recuperare, per ogni soggetto valutato, le informazioni su razza, sesso, età e allevamento di origine.

La scheda è stata utilizzata inoltre, per la valutazione dello stato generale dell'animale, per l'eventuale rilevamento di sintomi clinici e per il tipo di macellazione eseguita.

## Scheda di valutazione bovini ante-mortem

N° PROG.	BOVINA			PASSAPORTO			MARCA AURICOLARE			IDENT. BDN			
	<24 M <input type="checkbox"/>	>24 M <input type="checkbox"/>	>30 M <input type="checkbox"/>	CONF <input type="checkbox"/>	N.C. <input type="checkbox"/>	Dx <input type="checkbox"/>	Sx <input type="checkbox"/>	CONF <input type="checkbox"/>	N.C. <input type="checkbox"/>	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>		
	STATO/SINTOMI DI MALATTIA						BUONO			INSODDISF.			
STATO GENERALE							<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>			
STATO NUTRIZIONALE	CACHESSIA SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>						<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>			
PELLE/MEMBRI/UNGHIONI/MAMMELLA							<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>			
PULIZIA	Se 3-4-5 Mac. Differita				CAT.1 <input type="checkbox"/>		CAT.2 <input type="checkbox"/>		CAT.3 <input type="checkbox"/>		CAT.4 <input type="checkbox"/>		CAT.5 <input type="checkbox"/>
SECRETO OCULARE/NASALE										NO <input type="checkbox"/>		SI <input type="checkbox"/>	
DIARREA							Se SI Mac. Emer. no separata			NO <input type="checkbox"/>		SI <input type="checkbox"/>	
DIFFICOLTA' RESPIRATORIE/TOSSE/ANNUSAMENTI										NO <input type="checkbox"/>		SI <input type="checkbox"/>	
TREMORI/CONTRAZIONI MUSCOLARI/LECCATURA MUSELLO										NO <input type="checkbox"/>		SI <input type="checkbox"/>	
TRAUMI DA TRASPORTO							Se SI Mac. Emer. no separata			NO <input type="checkbox"/>		SI <input type="checkbox"/>	
ANDATURA INCERTA, BARCOLLANTE/CADUTA INSPIEGABILE										NO <input type="checkbox"/>		SI <input type="checkbox"/>	
PAURA DEI PASSAGGI, SOGLIE, INCAVI							SE TUTTI SI			NO <input type="checkbox"/>		SI <input type="checkbox"/>	
IPERSENSIBILITA' AL RUMORE, ALLA LUCE O AL TOCCO							SOSPETTO			NO <input type="checkbox"/>		SI <input type="checkbox"/>	
NERVOSITA', AGGRESSIVITA', ANSIETA' ECCESSIVA							BSE			NO <input type="checkbox"/>		SI <input type="checkbox"/>	
ARRICCIAMENTO DEL NASO, DIGRIGNAMENTO DENTI										NO <input type="checkbox"/>		SI <input type="checkbox"/>	
	1 ORDINARIA			2 DIFFERITA/SEPARATA			3 EMERGENZA			4 EMERGENZA MAC.SEP.			
MACELLAZIONE	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>			

## RISULTATI

Il numero totale di bovini presi in esame è stato di 1296 ripartiti nelle diverse categorie animali come illustrato nella tabella n. 9.

Tabella n. 9 - Distribuzione dei soggetti per categoria di animale

Categoria	Vacca	Toro	Vitello (M)	Vitello (F)	Vitellone (M)	Vitellone (F)	Tot.
Numero animali	9	3	397	61	713	113	1296
%	0.23	0.69	30.63	4.70	55.01	8.71	100

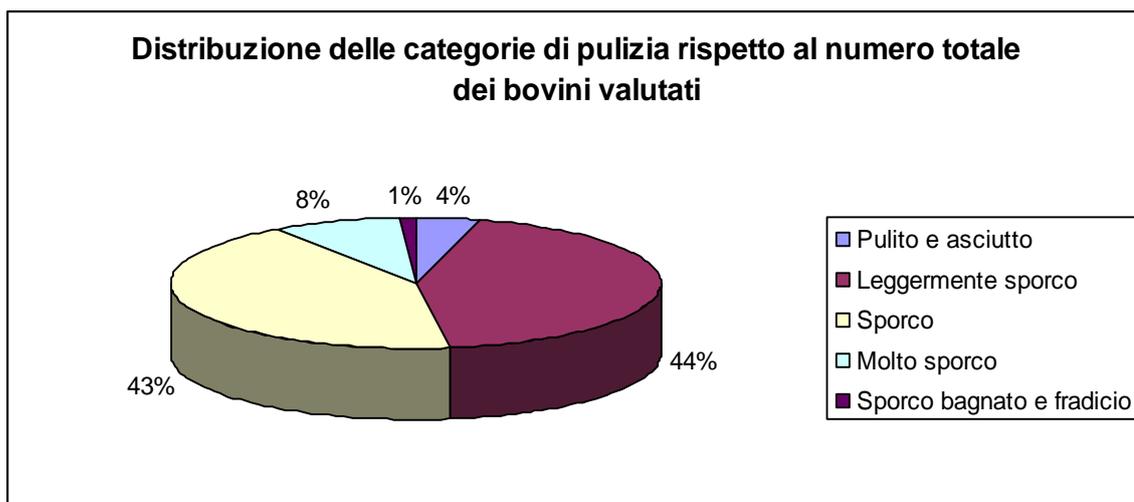
I soggetti valutati erano provenienti da 69 allevamenti distribuiti su tre regioni del nord Italia - Emilia Romagna, Lombardia e Veneto - e 5 province - Modena, Reggio Emilia, Cremona, Mantova e Verona - (Tabella n. 10). Delle 21 razze rappresentate, il 36.57% apparteneva alla razza Meticcio/incrocio, il 27.85% a quella Charolais ed il 21.21% alla Frisone italiana. Il 64.66% dei soggetti aveva un'età superiore agli 8 mesi.

Tabella n.10 - Distribuzione degli animali per provincia di provenienza.

PROVINCIA	MO	RE	VR	CR	MN	TOT.
Numero Aziende	33	9	3	5	19	69
%	20.9090	13.0434	4.3478	7.2463	27.5362	100

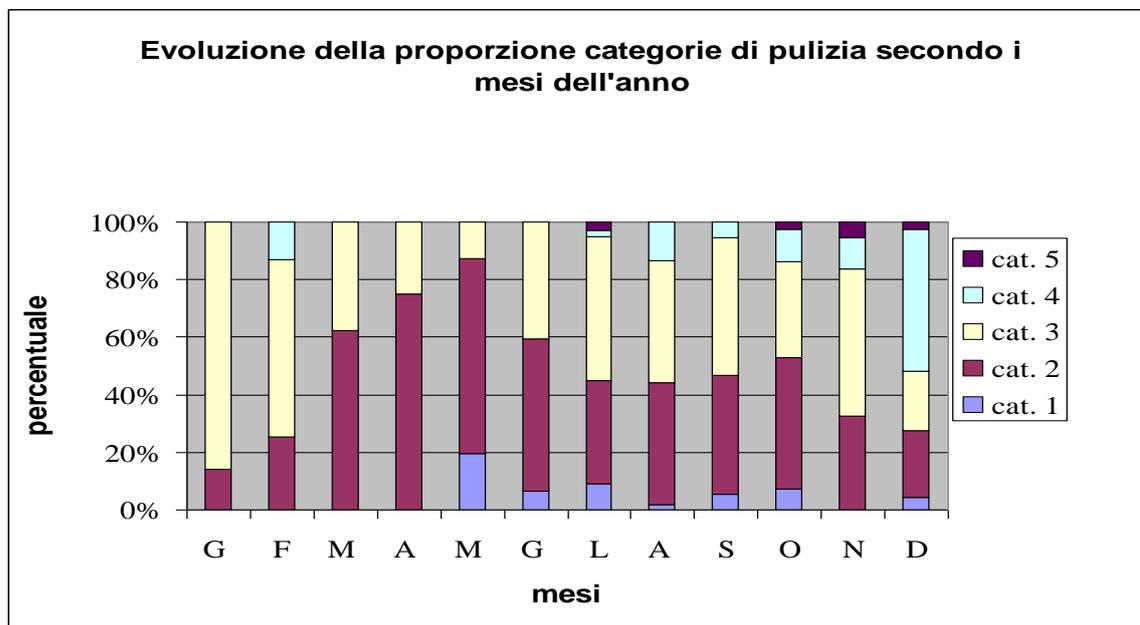
I dati raccolti indicano che, sul totale dei capi arrivati al macello, il 47.76% (categorie 1+2) è risultato in uno stato soddisfacente di pulizia e quindi idoneo alla macellazione come tale, mentre la restante percentuale presentava diversi gradi di insudiciamento. Il 42.74% risultava classificato in categoria 3, l'8.48% in categoria 4 e l'1% in categoria 5 (52.22%). La categoria all'interno della quale sono stati classificati più animali è stata la categoria 2 (43.59%) come mostrato nel grafico n. 4.

Grafico n. 4 - distribuzione categorie di pulizia in rapporto al numero totale di bovini valutati



Nel corso dell'anno, il mese in cui si evidenzia la percentuale maggiore di soggetti classificati nelle categorie "pulite" (cat. 1 e 2) è stato il mese di maggio (87.49% cat. 1+2). Al contrario il mese con il maggior numero di soggetti classificati nelle categorie "sporche" (categorie 3, 4, 5) è stato quello di gennaio (85.95%), nel quale tutti i soggetti sono stati classificati in categoria 3 (Grafico n. 5).

Grafico n. 5 - Evoluzione della proporzione categorie di pulizia secondo i mesi dell'anno.



I dati ottenuti rapportando le categorie di animali con il grado di pulizia sono riportati nella Tabella n. 11.

Tabella n. 11 - Distribuzione delle categorie di pulizia rispetto alle categorie di bovini valutati

Categorie	1	2	3	4	5	Tot. %
<b>Vacche</b>	22.22	44.44	11.11	11.11	11.11	100
<b>Tori</b>	0	0	100	0	0	100
<b>Vitelli (M)</b>	2.01	42.06	49.11	6.80	0	100
<b>Vitelli (F)</b>	6.55	44.26	42.62	6.55	0	100
<b>Vitelloni (M)</b>	5.181	45.30	40.25	7.57	1.68	100
<b>Vitelloni (F)</b>	2.65	38.93	37.16	21.23	0	100

I soggetti di età inferiore agli 8 mesi (vitelli M/F n = 458) sono risultati puliti nel 44,97% dei casi (cat.1+2). I soggetti con età superiore agli 8 mesi (tori+vacche+vitelloni M/F n = 838) lo sono stati invece nel 49,28% (cat. 1+2) dei casi. Considerando la variabile sesso, i soggetti maschi valutati (n=1113) sono risultati puliti (cat. 1+2) nel 48,06% dei casi, mentre le femmine (n = 183) nel 45,90% dei casi. Il confronto fra le razze è limitato a quelle più rappresentate (85,64% del totale): Meticcio/incrocio, Charolais e Frisone italiana. I soggetti di razza meticcio/incrocio sono risultati più puliti (48.51% cat. 1+2) rispetto ai soggetti di razza Charolais (56.78% cat. 3+4+5).

## CONSIDERAZIONI

I risultati ottenuti nel corso dell'indagine hanno un carattere particolare e locale e fotografano una situazione che non può in alcun modo essere traslata sul piano nazionale. Nelle indagini compiute oltralpe, valutando un numero di soggetti di gran lunga superiore (197.969 capi bovini) ed applicando il sistema di valutazione dell'Institut de l'Élevage, è stato messo in evidenza come il 75% dei soggetti classificati appartenesse alle categorie 1 o 2 (Bastien *et al.* 2006). Dal presente studio emerge invece, come più del 50% dei soggetti presentati alla macellazione sia risultato sporco. L'andamento annuale dei dati ha confermato quanto rilevato dagli autori francesi e cioè che vi è corrispondenza dei livelli migliori di pulizia in coincidenza della "bella stagione" che va indicativamente da marzo ad ottobre. Marzo, aprile, maggio e giugno sono i mesi in cui gli animali risultavano più puliti. Rispetto alla razza, anche nella nostra analisi, la più sporca è la razza Charolais: l'analisi è tuttavia limitata dall'esigua

presenza di soggetti di altre razze con cui confrontare i dati. I soggetti giovani, con meno di 8 mesi di età, sono risultati più sporchi rispetto agli adulti.

La messa a punto di uno schema di valutazione del grado di pulizia degli animali al macello, permette di applicare facilmente, con rapidità e precisione, un metodo che il responsabile dello stabilimento potrà utilizzare al fine di selezionare e dividere i soggetti idonei alla macellazione da quelli da trattare (pulizia del capo prima della macellazione, azione correttiva-gestione del rischio). Questo sistema potrà, inoltre, costituire uno strumento di giudizio a disposizione del veterinario ufficiale per definire a quale tipo di macellazione destinare i soggetti così classificati. Con la pubblicazione della nuova disciplina alimentare europea, diverse Autorità Nazionali per la Sicurezza degli Alimenti hanno definito sistemi propri di classificazione con l'obiettivo di mettere a disposizione degli operatori del settore alimentare e del controllo ufficiale gli strumenti utili a valutare il grado di pulizia degli animali. Le indicazioni fornite dalle autorità per la sicurezza alimentare di Inghilterra e Belgio, per quel che riguarda il giudizio ispettivo sono riportate nella tabella n. 12.

Tabella n. 12 - Valutazione del livello contaminazione della pelle di bovini al macello e giudizio ispettivo (Liuzzo *et al.*, 2007).

<b>Indice di pulizia (F.S.A. 2004)</b>	<b>Giudizio</b>	<b>Azione Correttiva</b>	<b>Note</b>
<b>1</b>	Idoneo macellazione	Nessuna	Macellazione ordinaria
<b>2</b>	Idoneo macellazione	Senza speciali trattamenti	
<b>3</b>	NON IDONEO	NESSUNA	Possibile per motivi di benessere e/o eradicazione di malattie
<b>4</b>	NON IDONEO	NESSUNA	
<b>5</b>	NON IDONEO	NESSUNA	
<b>Indice di pulizia (AFSCA 2006)</b>	<b>Giudizio</b>	<b>Azione Correttiva</b>	<b>Note</b>
<b>1</b>	Idoneo macellazione		Macellazione ordinaria
<b>2</b>	Idoneo macellazione	Prima della macellazione	Azioni correttive
<b>3</b>	NON IDONEO	Prima della macellazione	

### **VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' BATTERICIDA DELLA SOLUZIONE 259 SU MATRICI ALIMENTARI CARNEE**

Come precedentemente dimostrato, il lavaggio delle carni con acqua o altre soluzioni disinfettanti è un metodo utilizzato in vari paesi per assicurare una diminuzione della carica batterica totale e rendere il prodotto maggiormente sicuro.

Le industrie di lavorazione sono alla continua ricerca di prodotti innovativi, che presentino un efficace potere decontaminante, e allo stesso tempo offrano elevate garanzie di utilizzo. Si calcola che negli ultimi 10 anni, l'industria di lavorazione delle carni USA, abbia speso più di 750.000 milioni di dollari allo scopo di aumentare la sicurezza delle produzioni. Molti di questi sforzi sono stati indirizzati verso la ricerca di procedimenti innovativi, utili a rimuovere le contaminazioni microbiche dalle carcasse (USDA, 2006).

Negli ultimi anni, si sta cercando di valutare l'impiego dell'ozono e particolari soluzioni di acqua elettrolizzata (EO), quali agenti decontaminanti su matrici alimentari come per esempio le carni fresche (Bosilevac et al. 2005b).

L'efficacia disinfettante dell'ozono e dell'acqua elettrolizzata (EOW), è stata dimostrata nei confronti di *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* (Fabrizio and Cutter, 2003; Restaino et al., 1995) e su altri microrganismi patogeni associati agli alimenti quali *Listeria monocytogens* (Kim et al., 2000; Restaino et al., 1995).

Bosilevac et al. (2005), hanno valutato la possibile applicazione delle EOW come trattamento decontaminante da utilizzare per la pulizia della cute di bovini. Il lavaggio con EOW dimostra essere efficace nella riduzione sia della flora aerobica totale che della conta in *Enterobacteriaceae*; allo stesso modo, risulta capace di ridurre la prevalenza di *Escherichia coli* O157 da 89% pretrattamento fino al 31% a seguito del trattamento.

Nel presente contributo sperimentale si è provveduto a testare l'attività battericida sviluppata da soluzioni di Acqua Ossidante Elettrolizzata (EO) su matrici alimentari carnee e valutare l'influenza del trattamento sulle caratteristiche organolettiche dell'alimento.

## ACQUA OSSIDANTE ELETTROLIZZATA (EO)

La Soluzione 259 è un'acqua ossidante elettrolizzata (EO). L'EO è stata già largamente utilizzata in Giappone in campo medico ed odontoiatrico per il trattamento delle ferite e per la disinfezione delle attrezzature e strumenti chirurgici (Venkitanarayanan et al., 1999; Stan and Daeschel, 2003). L'EO viene prodotta a partire da una soluzione diluita di NaCl (2 g/L circa) che viene sottoposta ad elettrolisi; all'applicazione della corrente si vengono a creare due tipi di acqua: il catodo produce un'acqua elettrolizzata alcalina contenente idrossido di sodio diluito (pH 11,6, ORP -795mV) e l'anodo un'acqua elettrolizzata acida contenete acido ipocloroso diluito (pH 2,4 – 2,7, ORP 1150 mV circa) e  $50 \pm 10$  ppm di cloro libero.

Il potere disinfettante dell'EO è dovuto al suo pH acido, alla presenza di cloro libero e di acido ipocloroso e al suo ORP (Sharma and Demirci, 2003). L'acido ipocloroso inattiva la cellula batterica mediante l'ossidazione dei composti solfidrici della superficie cellulare, inattivando gli enzimi coinvolti nella respirazione, inibendo la produzione di ATP e ritardando i sistemi di trasporto (Park et al., 2002a). L'elevato potenziale di ossidoriduzione sequestra gli elettroni dalla membrana cellulare rendendola instabile e favorendo l'entrata delle componenti antimicrobiche all'interno della cellula (Park et al., 2002b).

Il suo potere disinfettante è stato valutato su superfici e su alimenti di origine diversa. Sulle superfici il suo potere disinfettante è stato dimostrato numerose volte (Park et al., 2002b; Liu et al., 2005; Serraino et al., 2006) e la sua efficacia su matrici organiche è stata indicata in diversi lavori su vegetali (Izumi, 1999; Casadiego et al., 2005). In alimenti di origine animale, specialmente carni, la sua attività è stata timidamente segnalata (Park et al., 2002a; Fabrizio et al., 2002; Fabrizio et al., 2004; Park et al., 2005) ma necessita di ricerche orientate ad ottenere significativa conferma.

Nella presente ricerca carni di bovino, suino e pollo sono state contaminate con microrganismi, patogeni e non, e sottoposte a diverse tipologie di trattamento con electrolyzed oxidizing water allo scopo di valutare l'efficacia di ogn'uno di questi metodi.

## **MATERIALI E METODI**

Tutti i test sono stati effettuati presso il laboratorio di Microbiologia della Sezione di Igiene e Tecnologia Alimentare della facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli studi di Bologna.

### **Soluzione 259**

La soluzione 259 (EO) è stata fornita dalla ditta Akuatech; all'atto della fornitura, così come prima e dopo trattamento delle carni, è stato verificato il pH e il potenziale di ossidoriduzione mediante pHmetro Hanna Instruments HI 98240 con elettrodi R334 (ORP) FC201D (pH).

### **Preparazione delle colture batteriche**

#### **Carica mesofila totale**

La carica mesofila totale è stata allestita effettuando un tampone su superfici contaminate, presso il Macello Sperimentale della Facoltà di medicina Veterinaria

dell'Università degli Studi di Bologna, a fine giornata di macellazione, prima che venissero effettuate le operazioni di detersione e disinfezione; sono state campionate 3 superfici:

- una superficie di acciaio per lo scivolo visceri;
- una superficie in teflon del tavolo di sezionamento;
- una superficie in ceramica del pavimento all'altezza della fase di scuoiatura.

Il campione è stato realizzato con un tampone di cotone su una superficie di 100 cm<sup>2</sup>. Da ciascun campione è stata effettuata una carica mesofila standard su Standard Plate Count Agar (PCA) per spatolamento in modo da agevolare, successivamente, la raccolta delle colonie. Per la preparazione della carica mesofila standard sono state scelte le piastre dalle diluizioni che presentavano le differenti colonie ben isolate le une dalle altre. Dalle piastre sono state raccolte con una spatola tutte le colonie presenti e risospese in 100 ml di soluzione fisiologica in modo da ottenere una sospensione standard ad un titolo 3 della scala di *Mc Farland*, corrispondente a circa  $9 \times 10^8$  ufc/ml. Il titolo effettivo della sospensione (standard) è stato verificato mediante conta in piastra su PCA.

### **Salmonella Typhimurium**

Per la preparazione dell'inoculo batterico sono stati utilizzati tre ceppi di *Salmonella typhimurium*:

1. ATCC 14028;

2. un ceppo di campo isolato da carni avicole;
3. un ceppo di campo isolato da carni suine.

I ceppi sono stati seminati separatamente su Tryptone Soya Agar addizionato con Bacto Yeast Extract (Difco) (TSAY) (Oxoid) e incubati per 24 ore. Le colonie sono state sospese in 10 ml di soluzione fisiologica in modo da ottenere tre sospensioni ad un titolo di 3 della scala di *Mc Farland* corrispondente a circa  $9 \times 10^8$  ufc/ml. Sono stati di seguito prelevati 2 ml da ciascuna sospensione e miscelati insieme in un'unica provetta in modo da ottenere una sospensione contenente approssimativamente la stessa quantità di cellule di ciascun ceppo batterico. Il titolo effettivo della sospensione (standard) è stato verificato mediante conta in piastra su TSAY. Al momento dell'uso la sospensione standard è stata diluita in modo da ottenere un inoculo pari a circa  $10^7$  ufc/ml.

### **Staphylococcus aureus**

Per la preparazione dell'inoculo batterico sono stati utilizzati tre ceppi di *Staphylococcus aureus*:

1. ATCC 25923;
2. un ceppo di campo isolato da latte bovino;
3. un ceppo di campo isolato da carni avicole.

I ceppi sono stati seminati separatamente su TSAY (Difco) (Oxoid) e incubati per 24 ore. Le colonie sono state sospese in 10 ml di soluzione fisiologica in modo da ottenere tre sospensioni ad un titolo di 3 della scala di *Mc Farland* corrispondente a circa  $9 \times 10^8$

ufc/ml. Sono stati poi prelevati 2 ml da ciascuna sospensione e miscelati insieme in un'unica provetta in modo da ottenere una sospensione contenente approssimativamente la stessa quantità di cellule di ciascun ceppo batterico. Il titolo effettivo della sospensione (standard) è stato verificato mediante conta in piastra su TSAY. Al momento dell'uso la sospensione standard è stata diluita in modo da ottenere un inoculo pari a circa  $10^7$  ufc/ml.

### **Listeria monocytogenes**

Per la preparazione dell'inoculo batterico sono stati utilizzati tre ceppi di *Listeria monocytogenes*:

1. ATCC 7644;
2. un ceppo di campo isolato da carni suine;
3. un ceppo di campo isolato da feci bovine.

I ceppi sono stati seminati separatamente su TSAY (Difco) (Oxoid) e incubati per 24 ore. Le colonie sono poi state sospese in 10 ml di soluzione fisiologica in modo da ottenere tre sospensioni ad un titolo di 3 della scala di *Mc Farland* corrispondente a circa  $9 \times 10^8$  ufc/ml. Da ciascuna sospensione sono stati prelevati 2 ml e miscelati insieme in un'unica provetta in modo da ottenere una sospensione contenente approssimativamente la stessa quantità di cellule di ciascun ceppo batterico. Il titolo effettivo della sospensione (standard) è stato verificato mediante conta in piastra su TSAY. Al momento dell'uso la sospensione standard è stata diluita in modo da ottenere un inoculo pari a circa  $10^7$  ufc/ml.

## Escherichia coli

Per la preparazione dell'inoculo batterico sono stati utilizzati due ceppi di *Escherichia coli*:

1. ATCC 700927 (O157:H7);
2. un ceppo di campo(O157:H7) isolato da carni bovine.

I ceppi sono stati seminati separatamente su TSAY (Difco) (Oxoid) e incubati per 24 ore. Le colonie sono state poi sospese in 10 ml di soluzione fisiologica in modo da ottenere tre sospensioni ad un titolo di 3 della scala di *Mc Farland* corrispondente a circa  $9 \times 10^8$  ufc/ml. Da ciascuna sospensione sono stati prelevati 2 ml e miscelati insieme in un'unica provetta in modo da ottenere una sospensione contenente approssimativamente la stessa quantità di cellule di ciascun ceppo batterico. Il titolo effettivo della sospensione (standard) è stato verificato mediante conta in piastra su TSAY. Al momento dell'uso la sospensione standard è stata diluita in modo da ottenere un inoculo pari a circa  $10^7$  ufc/ml.

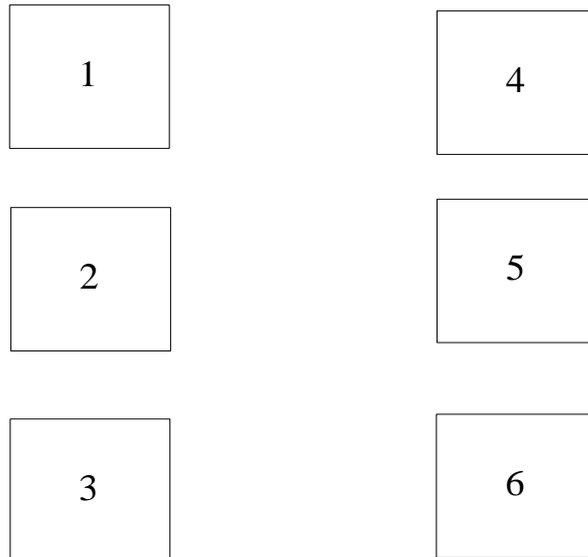
## TEST 1: TRATTAMENTO DI SPRAYZZAZIONE PER 5''.

### Preparazione della matrice carnea.

Il test di sprayzzazione per 5'' è stato effettuato sulle seguenti matrici carnee:

1. carne bovina: polpa;
2. carne suina: polpa;
3. carne avicola: cute di pollo;

I campioni sono stati acquistati presso un punto vendita al dettaglio. Sono stati selezionati tagli o pezzi nei quali fosse possibile delimitare 6 aree contigue di 10 cm<sup>2</sup>



secondo lo schema seguente:

I tagli o pezzi sono stati sottoposti a decontaminazione mediante immersione in alcool etilico assoluto, evaporazione e trattamento con raggi UV per una notte. Le aree delimitate sono state quindi prelevate per escissione e sottoposte a contaminazione sperimentale.

### Contaminazione delle carni

Un pezzo o taglio per ciascuna tipologia di carne è stato inoculato con ciascuno dei seguenti inoculi:

Inoculo A: è stata preparata una sospensione ottenuta miscelando 5 ml della sospensione standard di carica mesofila totale ( $9 \times 10^8$  ufc/ml) e 5 ml della soluzione standard di *Salmonella Typhimurium* diluita in modo da ottenere una sospensione di  $10^6$  ufc ml<sup>-1</sup> di *Salmonella Typhimurium*; 100 µL di questa sospensione sono stati utilizzati per l'inoculo di 10 cm<sup>2</sup> ottenendo quindi una contaminazione pari a circa  $10^6$  ufc/cm<sup>2</sup> di carica mesofila e  $10^4$  ufc/cm<sup>2</sup> di *Salmonella Typhimurium*.

Inoculo B: è stata preparata una sospensione ottenuta miscelando 5 ml della sospensione standard di carica mesofila totale ( $9 \times 10^8$  ufc/ml) e 5 ml della soluzione standard di *Staphylococcus aureus* diluita in modo da ottenere una sospensione di  $10^6$  ufc/ml di *Staphylococcus aureus*; 100 µL di questa sospensione sono stati utilizzati per l'inoculo di 10 cm<sup>2</sup> ottenendo quindi una contaminazione pari a circa  $10^6$  ufc/cm<sup>2</sup> di carica mesofila e  $10^4$  ufc/cm<sup>2</sup> di *Staphylococcus aureus*.

Inoculo C: è stata preparata una sospensione ottenuta miscelando 5 ml della sospensione standard di carica mesofila totale ( $9 \times 10^8$  ufc/ml) e 5 ml della soluzione standard di *Listeria monocytogenes* diluita in modo da ottenere una sospensione di  $10^6$  UFC/ml *Listeria monocytogenes*.; 100 µL di questa sospensione sono stati utilizzati

per l'inoculo di  $10 \text{ cm}^2$  ottenendo quindi una contaminazione pari a circa  $10^6 \text{ ufc/cm}^2$  di mesofila e  $10^4 \text{ UFC/cm}^2$  di *Listeria monocytogenes*..

Inoculo D: è stata preparata una sospensione ottenuta miscelando 5 ml della sospensione standard di carica mesofita totale e 5 ml della soluzione standard di *Escherichia coli*. Tale sospensione è stata successivamente diluita in modo da ottenere una concentrazione di  $10^7 \text{ ufc/ml}$  di carica mesofita totale e una sospensione di  $10^6 \text{ ufc/ml}$  di *Escherichia coli*. 100  $\mu\text{L}$  di questa sospensione sono stati utilizzati per l'inoculo di  $10 \text{ cm}^2$  ottenendo quindi una contaminazione pari a circa  $10^5 \text{ UFC/cm}^2$  di mesofila e  $10^4 \text{ ufc/cm}^2$  di *Escherichia coli*.

In totale quindi sono state inoculate 6 aree per ciascuno dei 4 inoculi precedentemente riportati.

I pezzi dopo escissione sono stati suddivisi, e per ciascun inoculo, 3 sono stati sottoposti a trattamento per sprayzzazione a bassa pressione per 5'' con acqua di rete (controllo) e 3 con la soluzione 259.

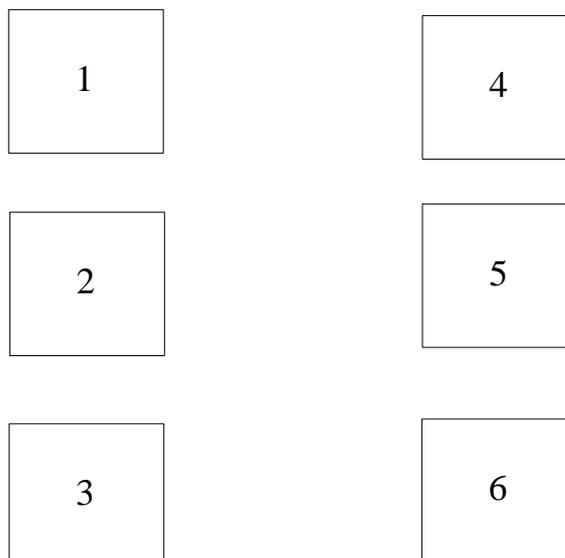
## TRATTAMENTO DI SPRAIZZAZIONE PER 15''.

### Preparazione della matrice carnea.

Il test di sprayzzazione per 15'' è stato effettuato sulle seguenti matrici carnee:

1. carne bovina: polpa;
2. carne suina: cotenna (pancetta fresca);
3. carne avicola: cute di pollo.

I campioni sono stati acquistati presso un punto vendita al dettaglio. Sono stati selezionati tagli o pezzi nei quali fosse possibile delimitare 6 aree contigue di 10 cm<sup>2</sup>



secondo lo schema seguente:

### *Contaminazione delle carni*

Un pezzo o taglio per ciascuna tipologia di carne è stato inoculato con ciascuno dei seguenti inoculi:

Inoculo E: 100  $\mu\text{L}$  della sospensione di  $10^7$  ufc/ml di *Salmonella Typhimurium* sono stati utilizzati per l'inoculo di  $10\text{ cm}^2$  di carne ottenendo quindi una contaminazione pari a circa  $10^5$  ufc/cm<sup>2</sup>.

Inoculo F: 100  $\mu\text{L}$  della sospensione di  $10^7$  ufc/ml di *Staphylococcus aureus* sono stati utilizzati per l'inoculo di  $10\text{ cm}^2$  di carne ottenendo quindi una contaminazione pari a circa  $10^5$  ufc/cm<sup>2</sup>.

Inoculo G: 100  $\mu\text{L}$  della sospensione di  $10^7$  ufc/ml di *Listeria monocytogenes* sono stati utilizzati per l'inoculo di  $10\text{ cm}^2$  di carne ottenendo quindi una contaminazione pari a circa  $10^5$  ufc/cm<sup>2</sup>.

Inoculo H: 100  $\mu\text{L}$  della sospensione di  $10^7$  ufc/ml di *Escherichia coli* O157:H7 sono stati utilizzati per l'inoculo di  $10\text{ cm}^2$  di carne ottenendo quindi una contaminazione pari a circa  $10^5$  ufc/cm<sup>2</sup>.

Tutte le sospensioni batteriche sono state lasciate asciugare a temperatura ambiente prima di procedere al trattamento delle carni.

In totale quindi sono state inoculate 6 aree per ciascuno dei 4 inoculi precedentemente riportati.

I pezzi dopo escissione sono stati suddivisi e, per ciascun inoculo, 3 sono stati sottoposti a trattamento per sprayzzazione a bassa pressione per 15'' con acqua di rete (controllo) e 3 con la soluzione 259.

## **TRATTAMENTO PER IMMERSIONE**

### **Preparazione delle matrici carnee**

La carne oggetto di studio è stata la carne di pollo.

I campioni sono stati acquistati presso un punto vendita scegliendo confezioni di carcasse di pollo omogenee. Su ciascun campione di carne di pollo sono state delimitate con l'aiuto di un delimitatore e di bisturi sei aree di  $10\text{ cm}^2$ , da inoculare e sottoporre ai trattamenti, tre per ogni emicarcassa; le carcasse sono state quindi divise in due emicarcasse e ciascuna di queste sottoposta ad un trattamento diverso.

### **Contaminazione delle carni**

Le matrici carnee sono state contaminate con gli inoculi E, F, G ed H, come descritto precedentemente.

### **Trattamento.**

I campioni sono stati divisi in due gruppi in funzione del trattamento a cui sono stati sottoposti:

Per ogni tipo di contaminazione (E, F, G ed H) 3 aree (corrispondenti a 4 emicarcasse) sono state immerse in un bagno contenente 6 litri di acqua elettrolizzata alcalina ed in seguito immersi in un bagno contenente 6 litri di acqua elettrolizzata acida.

La procedura è stata ripetuta 3 volte variando i tempi di immersione: 1, 2 e 5 minuti.

Parallelamente per ogni tipo di contaminazione (E, F, G ed H) 3 aree (corrispondenti a 4 emicarcasse) sono state immerse in un bagno contenente 6 litri di acqua di rete per un tempo complessivo di 2, 4 o 10 minuti.

## ISOLAMENTO E CONTA DEI MICRORGANISMI

Dopo i rispettivi trattamenti, le aree delimitate sono state prelevate e si è proceduto all'isolamento e conta dei microrganismi. Ciascun campione inoculato, posto all'interno di un sacchetto sterile, è stato sospeso in 90 ml di fisiologica peptonata sterile e omogeneizzato allo stomaker per 3 minuti. 1 ml della sospensione così ottenuta e 1 ml di 5 diluizioni seriali in base 10 sono state seminate per determinazione della carica mesofila totale, che è stata effettuata mediante conta per inglobamento su PCA (Oxoid) incubato a 30°C per 72 ore.

100 µL della sospensione e 100 µL di 3 diluizioni seriali in base 10 sono state seminate per la conta della specie batterica utilizzata nei differenti test.

La conta di *Salmonella Typhimurium* è stata effettuata mediante spatolamento su XLD Medium (Oxoid) incubato a 37°C per 24 h.

La conta di *Staphylococcus aureus* è stata effettuata mediante spatolamento su Baird - Parker Agar (Difco) incubato a 37°C per 24 – 48 h.

La conta di *Listeria monocytogenes* è stata effettuata mediante spatolamento su *Listeria Selective Agar Oxford Formulation* (Oxoid) incubato a 37°C per 48h.

La conta di *Escherichia coli* O157:H7 è stata effettuata mediante spatolamento su Sorbitol MacConkey Agar (Oxoid) incubato a 37°C per 24h.

## **ELABORAZIONE DEI DATI**

I dati sono stati elaborati mediante test statistici parametrici; vista la distribuzione normale dei dati è stato utilizzato il T test di Student con il programma SPSS (ver. 12) confrontando le popolazioni batteriche residue a seguito di trattamento con Soluzione 259 e acqua di rete. Con il medesimo programma è stata calcolata la tendenza della differenza di riduzione della popolazione batterica ottenuta a seguito di applicazione dell'EO acqua di rete per i differenti tempi.

## **TEST ORGANOLETTICO**

È stato eseguito un test triangolare a 24 panellisti, per valutare l'effetto organolettico dell'applicazione della soluzione 259 alla carne.

Il numero dei partecipanti al test è stato scelto basandosi sulle indicazioni riportate da ISO-4120 (16) considerando un alfa-rischio= 0,05 (la probabilità di concludere che una differenza esiste fra i campioni mentre non esiste) e un beta-rischio= 0,05 (probabilità di concludere che non esiste una differenza fra i campioni mentre una differenza esiste).

Un pezzo di carne di pollo di 180 gr è stato immerso in 6 litri di soluzione 259 per un minuto. Un secondo pezzo di carne di 180 gr, usato come controllo, è stato invece trattato con acqua di rete. Entrambi i pezzi sono stati macinati separatamente e sono state preparate delle polpette di carne macinata di 10 gr ciascuna. Ogni polpetta è stata cotta in microonde dentro una capsula petri di vetro per 1 minuto a 450W al fine di ottenere un campione cotto di una temperatura a cuore di 71°C.

A ciascun campione trattato e di controllo è stato assegnato un codice, contenente un numero da 1-6 e una lettera A/B. Le varie combinazioni dei 3 campioni codificati, vale a dire ABB, BAA, AAB, ABA, BBA e BAB, sono stati ripetuti 4 volte per ottenere 24 possibilità.

Il test è stato eseguito dividendo i panellisti in coppie, e facendoli sedere l'uno fronte all'altro con un divisore in modo da non potersi vedere. Ciascuno dei due panellisti ha ricevuto tre campioni di carne calda e 2 schede di valutazione. In primo momento è stato richiesto a ciascuno dei panellisti di odorare la carne, procedendo da sinistra verso destra, e di indicare quale campione percepissero come differente all'olfatto. A questo punto ai panellisti è stato chiesto di scambiarsi posto e di procedere alla seconda parte del test valutando i 3 campioni dell'altro panellista. Successivamente è stato richiesto ai panellisti di assaggiare i tre campioni di carne, sempre procedendo da sinistra verso destra, e di indicare un campione percepito come differente dagli altri due dal punto di vista del gusto.

## DETERMINAZIONE DEL NUMERO DEI PEROSSIDI IN PRODOTTI

### CARNEI TRATTATI CON SOLUZIONE 259

La prova ha lo scopo di valutare l'eventuale influenza di un trattamento con EOW sulla componente lipidica di matrici carnee. Più in particolare sono stati analizzati i seguenti prodotti:

- cute di pollo;
- muscolo di pollo;
- muscolo di tacchina;
- taglio grasso di suino (coppa);
- taglio magro di suino (lonza);
- muscolo di manzo.

L'analisi dei campioni è stata condotta in due tempi. Al tempo 0 dai sei differenti campioni è stata prelevata un'aliquota sulla quale sono state effettuate l'estrazione lipidica e la successiva determinazione del numero dei perossidi.

Sempre al tempo 0 da ciascun campione sono state ricavate altre due aliquote; una è stata immersa per circa 30 secondi in EO, l'altra è stata trattata analogamente con acqua distillata.

Sia i campioni controllo che quelli trattati sono stati quindi conservati in frigorifero in attesa di essere successivamente analizzati. Al tempo 1 (dopo 7 giorni dall'inizio della

prova) sono state effettuate l'estrazione lipidica e la titolazione dei perossidi sulle aliquote trattate con EOW e su quelle di controllo.

### **Estrazione lipidica**

L'estrazione dei lipidi totali dai prodotti carnei è stata effettuata nel modo qui di seguito riportato.

Al fine di ottenere una quantità di lipidi sufficiente per la successiva determinazione dei perossidi si è deciso di partire da campioni del peso di 30 gr. Per la pelle di pollo, matrice molto grassa, abbiamo scelto invece di partire da una quantità di 9 gr. I tessuti di carne sono stati quindi tagliati in piccoli pezzi e pesati su una bilancia analitica.

Per estrarre i lipidi dalla matrice è stata utilizzata una miscela estraente composta da cloroformio:metanolo in rapporto di 2:1 e addizionata di BHT allo 0,005%. Considerando che per ciascun grammo di tessuto sono necessari circa 17 mL di miscela estraente, per la pelle di pollo sono stati utilizzati 150 mL di miscela, mentre per tutti gli altri prodotti carnei sono stati utilizzati 500 mL.

La carne, già suddivisa in pezzetti e pesata, è stata quindi omogeneizzata utilizzando l'Ultraturrax in modo da ottenere una buona dispersione del campione. Per poter facilitare questa operazione si è aggiunto solo un terzo del volume totale di miscela estraente. Il volume restante di miscela estraente è stato quindi aggiunto solo ad omogeneizzazione avvenuta.

L'omogenato così ottenuto è stato posto in agitazione per un'ora, al termine della quale è stato filtrato con filtro büchner sotto vuoto e posto in un imbuto separatore.

Nell'imbuto separatore è stata quindi aggiunta una soluzione di potassio cloruro KCl 0,88% in rapporto di 1:4 rispetto alla fase organica usata come estraente (125 mL della soluzione di KCl sono stati utilizzati per tutti i campioni ad esclusione della pelle di pollo per la quale sono stati aggiunti solo 40 mL di soluzione KCl).

Dopo aver agitato vigorosamente l'imbuto per un paio di volte, avendo cura di aver fatto sfiatare i vapori del solvente, si è attesa la separazione delle due fasi liquide per circa un'ora.

La fase organica inferiore è stata quindi recuperata totalmente e a questa è stato aggiunto un eccesso di sodio solfato anidro. Per consentire una completa disidratazione a mezzo di  $\text{Na}_2\text{HSO}_4$  si è atteso circa mezz'ora prima di procedere alla filtrazione dell'estratto in un pallone di vetro di idonee dimensioni.

Infine si è portato a secco il solvente collegando il pallone all'evaporatore rotante e immergendolo in un bagno termostato a +40 °C.

### **Determinazione del numero dei perossidi**

La determinazione dei perossidi è stata effettuata mediante titolazione iodometrica. Tale titolazione è una titolazione indiretta in cui si titola lo iodio prodotto dall'ossidazione dello ioduro ad opera delle specie ossidanti presenti nel campione in esame; l'agente titolante usato per la determinazione dello iodio è il tiosolfato di sodio.

Per valutare la concentrazione dei prodotti primari dell'ossidazione lipidica (perossidi) sono state seguite le istruzioni operative riportate nella SOP.IA.10.01.034.

Si è proceduto innanzitutto a pesare esattamente sulla bilancia analitica il grasso estratto, avendo cura, dove possibile, di prelevarne almeno 0,5 gr.

Sono stati quindi aggiunti 25 mL di una soluzione di acido acetico:cloroformio in rapporto 3:2 nel quale si è solubilizzato il grasso.

In seguito sono stati addizionati 0,5 mL di una soluzione satura di potassio di ioduro e si è agitato il tutto per circa un minuto.

La soluzione di KI deve essere preparata poco prima dell'utilizzo sciogliendo del potassio di ioduro in acqua distillata fino a quando sul fondo del recipiente non rimane del KI insolubilizzato. Per prevenire l'ossidazione dello ioduro tale soluzione deve essere conservata al buio e ben chiusa.

Una volta aggiunto il potassio di ioduro il campione va posto al buio per circa 5 minuti al termine dei quali si aggiungono 75 mL di acqua distillata e procedendo poi alla titolazione.

La titolazione è stata effettuata utilizzando una soluzione di tiosolfato di sodio 0,001 N e mantenendo in agitazione il campione.

In prossimità della scomparsa della colorazione gialla del campione è stato aggiunto 1 mL di salda d'amido. La titolazione è stata quindi continuata fino alla scomparsa della colorazione blu.

Sia al tempo 0 che al tempo 1 è stata condotta anche una prova in bianco il cui valore deve essere detratto dal valore del campione.

Per l'espressione dei risultati della prova si è fatto riferimento alla formula riportata qui di seguito:

<b>Numero dei perossidi</b> (milliequivalenti di perossidi/kg di grasso) =	$\frac{S \times N \times 1000}{g \text{ di grasso}}$
---	--

Dove S sono i millilitri di soluzione di tiosolfato di sodio occorsi per la titolazione (corretti per il valore del bianco) ed N è la normalità della soluzione titolante utilizzata.

## RISULTATI

### **Soluzione 259**

La soluzione 259 utilizzata presentava le seguenti caratteristiche:

pH: 2.69;

ORP: 1135 mV.

### **Test 1 . trattamento per sprayzzazione per 5 secondi**

Nella tabella successiva (Tabella n. 13) sono riportati i risultati dei test di inattivazione della popolazione di carica mesofila totale e dei patogeni testati su carni bovine, suine e avicole.

Tabella n.13 - Efficacia di EO su una popolazione di carica mesofila totale e patogeni dopo sprayzzazione per 5''

	Popolazione batterica ( $\log_{10}$ CFU/cm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>					
	Suino		Bovino		Carne avicola	
	Acqua 5 s	EO 5 s	Acqua 5 s	EO 5 s	Acqua 5 s	EO 5 s
<b>Carica mesofila totale</b> <sup>a</sup>	8,87±0,8 4	8,39±1,1 3	9,15±0,7 9	8,64±1,2	9,15±0,7 1	8,79±0,9 1
<b><i>S. Typhimurium</i></b> <sup>b</sup>	3,34±0,6 1	2,95±0,4 3	3,27±0,6 9	2,67±0,2 8	1,10±1,9 c	N.D. <sup>c</sup>
<b><i>S. aureus</i></b> <sup>b</sup>	2,74±0,2 8	1,53±1,3 6 <sup>c</sup>	2,61±0,1 5	2,31±0,2 7	2,56±0,0 7	0,76±1,3 2 <sup>c</sup>
<b><i>L. monocytogenes</i></b> <sup>b</sup>	2,78±0,6 8	1,69±1,5 6 <sup>c</sup>	2,88±0,0 3	1,69±1,4 8 <sup>c</sup>	3,56±0,2 2	2,25±0,4 4
<b><i>E. coli</i></b> <sup>b</sup>	3,44±0,6 3	2,86±0,4 1	3,15±0,6 5	2,51±0,1 2	2,34±0,1 7	1,23±0,4 3

<sup>a</sup> media di dodici prove ± deviazione standard

<sup>b</sup> media di tre prove ± deviazione standard

<sup>c</sup> nessuna cellula vitale evidenziata tramite la semina in piastra in uno o due test

L'applicazione per 5 secondi della soluzione 259 alle matrici carnee determina una riduzione della carica batterica compresa tra 0,30 Log della carica mesofila totale su carne di bovino e 1,79 Log per la carica di *Staphylococcus aureus* nelle carni avicole.

Il dettaglio dei valori di abbattimento per i vari microrganismi testati nelle differenti matrici carnee sono riportati nella seguente tabella n. 14.

Tabella n. 14 - Abbattimento della popolazione di carica mesofila totale e patogeni dopo sprayzzazione per 5''

	Riduzione della popolazione batterica (log <sub>10</sub> CFU/cm <sup>2</sup> )		
	Suino	Bovino	Carne avicola
<b>Carica mesofila totale</b> <sup>a</sup>	0,47	0,64	0,93
<b><i>S. Typhimurium</i></b> <sup>b</sup>	0,38	0,60	1,10
<b><i>S. aureus</i></b> <sup>b</sup>	1,20	0,30	1,79
<b><i>L. monocytogenes</i></b> <sup>b</sup>	1,09	1,19	1,30
<b><i>E. coli</i></b> <sup>b</sup>	0,58	0,64	1,11

<sup>a</sup> media di dodici prove ± deviazione standard

<sup>b</sup> media di tre prove ± deviazione standard

I dati evidenziano una notevole variabilità di comportamento sia per quanto riguarda la sensibilità di una specie batterica inoculata in differenti matrici carnee, sia per quanto riguarda l'efficacia su differenti specie batteriche in una matrice carnea. La variabilità è, a nostro giudizio, da imputare principalmente alla tipologia di superficie dei differenti tagli anatomici utilizzati: polpa per il suino e il bovino, che risultano meno regolari e più anfrattuose e cute per le carni avicole. Un altro elemento è da correlare alle modalità di decontaminazione applicate prima dell'inoculo batterico e al relativamente basso livello di patogeni inoculati che in alcuni test tende a rendere variabile la lettura. Nei test successivi si è quindi provveduto a modificare i tagli anatomici utilizzati (polpa per il bovino, cotenna per il suino e cute per gli avicoli) e a modificare i livelli di contaminazione applicati, utilizzando la carica mesofila

naturalmente contaminante ed aumentando il livello di inoculo dei microrganismi patogeni.

### Test 2 . trattamento per sprayzzazione per 15 secondi

Nella tabella n.15 sono riportati i risultati dei test di inattivazione della popolazione di carica mesofila totale e dei patogeni testati su carni bovine, suine e avicole.

Tabella n. 15 - Efficacia di EO su una popolazione di carica mesofila totale e patogeni dopo sprayzzazione per 15''

	Popolazione batterica ( $\log_{10}$ CFU/cm <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>					
	Suino		Bovino		Carne avicola	
	Acqua 5 s	EO 5 s	Acqua 5 s	EO 5 s	Acqua 5 s	EO 5 s
<b><i>S. Typhimurium</i></b>	5,96±0,11	5,32±0,40	6,34±0,01	6,10±0,05	4,86±0,03	4,43±0,24
<b><i>S. aureus</i></b>	6,71±0,01	5,67±1,10	6,77±0,00	6,55±0,08	6,70±0,01	5,67±0,11
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	5,79±0,12	5,32±0,40	6,69±0,00	6,39±0,07	5,76±0,12	4,42±0,24
<b><i>E. coli</i></b>	5,44±0,73	4,86±0,31	6,72±0,02	6,51±0,07	4,52±0,17	3,93±0,41

<sup>b</sup> media di tre prove ± deviazione standard

L'applicazione per 15 secondi della soluzione 259 alle matrici carnee determina una riduzione della carica batterica compresa tra 0,21 Log di *Staphylococcus aureus*

inoculato nella carne di bovino e 1,34 Log per la carica di *Listeria monocytogenes* nelle carni avicole.

Il dettaglio dei valori di abbattimento per i vari microrganismi testati nelle differenti matrici carnee sono riportati nella seguente tabella n. 16.

Tabella n.16 - Abbattimento della popolazione di carica mesofila totale e patogeni dopo sprayzzazione per 15''

	Riduzione della popolazione batterica ( $\log_{10}$ CFU/cm <sup>2</sup> )		
	Suino	Bovino	Carne avicola
<i>S. Typhimurium</i> <sup>b</sup>	0,64	0,24	0,43
<i>S. aureus</i> <sup>b</sup>	1,04	0,21	1,03
<i>L. monocytogenes</i> <sup>b</sup>	0,46	0,30	1,34
<i>E. coli</i> <sup>b</sup>	0,58	0,21	0,59

<sup>b</sup> media di tre prove  $\pm$  deviazione standard

Il test di abbattimento con applicazione della soluzione 259 mediante sprayzzazione per 15 secondi evidenzia valori di abbattimento più costanti qualora si consideri l'abbattimento delle diverse specie batteriche inoculate in una tipologia di carne; l'abbattimento è più marcato nelle carni avicole, intermedio nella carne suina e più modesto nella carne bovina. Tale aspetto è probabilmente da correlare alle diverse caratteristiche della superficie delle carni utilizzate (polpa per il bovino, cotenna per il suino e cute per le carni avicole).

L'applicazione della soluzione 259 sembra determinare una riduzione più marcata dei batteri Gram-positivi rispetto ai Gram-negativi.

### Test 3 . trattamento per immersione per 2, 4 e 10 minuti

Al fine di verificare la possibilità di aumentare il livello di abbattimento dei microrganismi patogeni si è provveduto ad effettuare un test supplementare mediante immersione delle carni nella frazione alcalina e successivamente nella soluzione 259. Tale test è stato condotto solo sulle carni avicole considerando l'eventualità dell'immersione a livello di produzione industriale applicabile solamente a carcasse di piccola taglia.

Nella tabella successiva (Tabella n. 17) sono riportati i risultati dei test di inattivazione della popolazione di carica mesofila totale e dei patogeni testati su carni avicole a seguito di immersione per 1, 2 e 5'.

Tabella n.17 - Efficacia di EO su una popolazione di microrganismi patogeni immersione

	Popolazione batterica ( $\log_{10}$ CFU/cm <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>					
	1 minuto		2 minuti		10 minuti	
	Acqua 5 s	EO 5 s	Acqua 5 s	EO 5 s	Acqua 5 s	EO 5 s
<i>S. Typhimurium</i>	6,17±0,08	5,69±0,00	6,37±0,13	5,83±0,15	6,50±0,02	5,75±0,11
<i>S. aureus</i>	6,51±0,02	5,67±0,01	6,45±0,04	4,655±0,09	6,57±0,02	5,19±0,11
<i>L. monocytogenes</i>	6,85±0,01	5,77±0,13	6,63±0,17	6,93±0,07	6,61±0,08	5,87±0,10
<i>E. coli</i>	6,61±0,12	5,86±0,01	6,44±0,23	5,73±0,23	6,20±0,02	5,63±0,51

<sup>b</sup> media di tre prove ± deviazione standard

L'immersione della carne avicola inoculata nella soluzione 259 determina una riduzione della carica batterica compresa tra 1,80 Log di *Staphylococcus aureus* dopo 2 minuti di applicazione e 0,47 Log per la carica di *Salmonella Typhimurium* dopo 1' di applicazione.

Il dettaglio dei valori di abbattimento per i vari microrganismi testati nelle differenti matrici carnee sono riportati nella seguente tabella n. 18.

Tabella n. 18 - Abbattimento della popolazione di microrganismi patogeni dopo sprayzzazione per 5''.

	Riduzione della popolazione batterica (log <sub>10</sub> CFU/cm <sup>2</sup> )		
	1 minuto	2 minuti	5 minuti
<i>S. Typhimurium</i> <sup>b</sup>	0,47	0,54	0,75
<i>S. aureus</i> <sup>b</sup>	0,84	1,80	1,38
<i>L. monocytogenes</i> <sup>b</sup>	1,07	0,70	0,73
<i>E. coli</i> <sup>b</sup>	0,89	1,07	0,89

<sup>b</sup> media di tre prove ± deviazione standard

Il test di abbattimento con applicazione della soluzione 259 mediante immersione evidenzia una maggiore sensibilità dei batteri Gram-positivi rispetto ai Gram-negativi.

## **ELABORAZIONE DEI DATI**

L'elaborazione statistica dei dati evidenzia una differenza significativa nella carica batterica residua a seguito di applicazione della soluzione 259 rispetto all'applicazione di acqua di rete ( $p < 0,001$ ). L'elaborazione dei dati evidenzia una maggior riduzione della popolazione batterica di almeno un Log a seguito dell'applicazione della soluzione 259 rispetto all'applicazione di acqua. L'analisi dei dati non evidenzia una tendenza ad una maggiore riduzione della popolazione batterica all'aumentare del tempo di applicazione.

### **TEST ORGANOLETTICO**

Nel primo test triangolare, atto a valutare differenze di odore fra i campioni di carne, 15 panellisti hanno individuato correttamente il campione trattato con un valore  $\alpha=0,05$  (la probabilità di concludere che una differenza esiste fra i campioni quando in realtà non esiste). Risulta che un numero di 13 risposte corrette è sufficiente per concludere che esiste una differenza percepibile fra i campioni. Di conseguenza, un numero di risposte corrette uguale a 15 indica che una esiste una differenza percepibile di odore fra il campione trattato e quello di controllo.

Nel secondo test triangolare, atto a valutare differenze di odore fra i campioni di carne, 13 panellisti hanno individuato correttamente il campione trattato. Analogamente risulta che un numero di 13 risposte corrette è sufficiente per concludere che esiste una differenza percepibile fra i campioni.

**DETERMINAZIONE DEL NUMERO DEI PEROSSIDI IN PRODOTTI CARNEI TRATTATI CON  
SOLUZIONE 259**

I risultati del test di determinazione del numero di perossidi è riportato nella seguente tabella n. 19.

Tabella n.19 - Determinazione del numero di perossidi a seguito di trattamento con EO

<b>Tipo di prodotto carneo</b>	<b>Tempo 0 (mEq)</b>	<b>Tempo 1 (controllo) (mEq)</b>	<b>Tempo 1 (trattato) (mEq)</b>
Cute di pollo	0,6	0,9	0,1
Muscolo di pollo	0,0	1,8	2,2
Muscolo di tacchino	3,4	5,8	7,2
Taglio magro di suino	0,9	0,8	1,9
Taglio grasso di suino	1,5	0,1	0,8
Manzo	4,0	10,2	7,4

## CONSIDERAZIONI

I dati raccolti nei test effettuati sia su microrganismi, patogeni e non, inoculati in matrici carnee confermano la spiccata attività battericida dell'acqua elettrolizzata.

I livelli di abbattimento rilevati sono sicuramente inferiori a quelli riportati sulle superfici e ciò può essere correlato sia alla presenza di materiale organico in abbondanza, che tende a rendere meno efficace l'azione battericida, sia all'anfrattuosità delle matrici carnee che proteggono meccanicamente i microrganismi.

L'applicazione in sequenza di acqua elettrolizzata alcalina e acida sembra determinare un aumento dell'efficacia dell'azione battericida. Tale aspetto, riportato in altri studi (Ayebah *et al.*, 2005), per quanto riguarda la disinfezione di superfici, è da correlare all'azione saponificante della frazione alcalina che reagendo con grassi e proteine che possono fungere da protettivi per i batteri presenti, facilitano il contatto tra la frazione acida, che costituisce la componente attiva, e il batterio.

L'efficacia dell'EO nell'inattivazione di microrganismi patogeni su matrici alimentari è stata testata in alcune matrici carnee da differenti autori (Bosilevac *et al.*, 2005b; Park *et al.*, 2002a; Fabrizio *et al.* 2002; Fabrizio *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2002b) .

Fabrizio e Cutter (2004) hanno dimostrato l'efficacia dell'EO nell'inattivazione di *Campylobacter coli* ma non di *Salmonella Typhimutium* e *Listeria monocytogenes* a seguito di applicazione per sprayzzazione per 15' su carne suina. Nel presente studio non è stata testata l'efficacia su *Campylobacter coli*; l'efficacia sia su *Listeria monocytogenes* che, in maniera più contenuta, su *Salmonella Typhimurium* si è dimostrata significativa. In un altro studio Park *et al.* (2002a) hanno dimostrato che il

lavaggio delle carcasse di pollo con EO determina una riduzione di 3 Log della carica di *Campylobacter jejuni*.

L'efficacia dell'EO nel ridurre la carica batterica presente sulle carni è stata confrontata con quella dell'acqua clorata, dell'acqua ozonata, dell'acido acetico, dell'acido e del trisodio fosfato (Bosilevac *et al.*, 2005; Fabrizio *et al.*, 2002; Fabrizio *et al.*, 2004) dimostrando un'efficacia comparabile agli altri tipi di trattamento. L'EO presenta rispetto all'acqua clorata, ai fini del contenimento delle cross contaminazioni che possono avvenire a seguito di lavaggi sequenziali di numerose carcasse, il vantaggio che possedendo un pH estremamente basso determina una più efficace inattivazione dei microrganismi che, rimossi dalle carni si trovano in sospensione (Fabrizio *et al.* 2002).

I test organolettici hanno evidenziato una percezione da parte dei pannellisti del trattamento effettuato; va tuttavia considerato che le prove organolettiche sono state effettuate immediatamente dopo il trattamento e che la cottura immediata delle carni trattate, con conservazione in capsula di vetro simulano le condizioni più vantaggiose possibili ai fini del riconoscimento delle carni trattate; nonostante questo solamente 15 e 13 pannellisti su 24 hanno correttamente identificato il prodotto trattato.

I risultati del test per la determinazione dei perossidi che ha lo scopo di valutare se l'applicazione dell'EO determini la produzione di prodotti primari dell'ossidazione non ha evidenziato un trend comune di modificazione nelle diverse matrici carnee trattate; non si rileva quindi una tendenza all'ossidazione e la variabilità evidenziata nel test rientra nella variabilità dovuta al metodo analitico e alla naturale disomogeneità dei campioni.

Il trattamento delle carni con EO può essere considerato una valida alternativa al trattamento con altri prodotti per il contenimento delle cariche batteriche e l'eliminazione dei microrganismi patogeni.

## CONCLUSIONI

Le conoscenze maturate durante le indagini compiute per la stesura della tesi, possono rappresentare una base di dati ed esperienze di notevole interesse per l'adozione di misure e protocolli per la riduzione della contaminazione delle carni. I dati ottenuti sulla valutazione obbiettiva e univoca del fattore pulizia degli animali possono supportare la predisposizione di linee guida nazionali, analogamente a quanto già operativo presso altri Stati (Francia, Gran Bretagna, Belgio). L'urgenza della misura è oltremodo determinata dall'esigenza di stabilire attraverso chiari criteri di giudizio anche relativi all'igiene degli animali, le modalità con cui il controllore ufficiale in caso di mancato rispetto a quanto stabilito dai Regolamenti Comunitari in materia di igiene della macellazione, debba applicare il regime sanzionatorio dettato dal D. L.vo del 6 novembre 2007, n. 193.

Le evidenze raccolte nel corso delle valutazioni, potrebbero, inoltre, rappresentare un utile strumento di giudizio che, messo a disposizione degli operatori del macello e del veterinario ufficiale, consentirebbe di effettuare, sulla base di evidenze oggettive, la valutazione di parametri utili ai fini del controllo del rispetto delle norme sulla protezione degli animali (D. L.vo 26 marzo 2001, N. 146; D. L.vo 30 dicembre 1992 N. 533; D. L.vo 1 settembre 1998 N. 331). La pulizia degli animali è un importante elemento di identificazione delle condizioni di allevamento, rappresentando un rilevante indicatore delle condizioni igienico-sanitarie degli animali e di conduzione della stalla (Confédération Nationale de l'Elevage, 2007). Al momento della

valutazione, sulla base del tipo di sporco riscontrato, possono essere effettuate considerazioni riguardo: stato sanitario e benessere degli animali, in particolare per quanto concerne la cura degli animali, lo spazio disponibile, il microclima, etc..

Il tipo di sporcizia riscontrato e le condizioni dei soggetti al momento dello scarico (animali imbrattati con feci di altri soggetti, presenza di lesioni cutanee etc.), è, inoltre, un utile strumento di valutazione delle condizioni di trasporto degli animali, che consente di verificare, insieme ad altri parametri, se tali condizioni siano state adeguate a quanto imposto dai Regolamenti comunitari riguardo la tutela del benessere degli animali durante il trasporto (Regolamento (CE) n.1/2005). Il veterinario ufficiale avrebbe in questo modo a disposizione un maggior numero di strumenti di valutazione, che gli consentirebbero di esprimere un giudizio più obiettivo sulle evidenze raccolte.

Un sistema codificato di valutazione dello stato di pulizia degli animali, a nostro parere potrebbe fornire, inoltre, un utile strumento di autovalutazione per gli operatori della produzione primaria. Consentendo di migliorare la gestione igienica dell'allevamento, soprattutto in vista di una possibile applicazione anche a livello nazionale, del sistema di declassamento delle pelli e delle carcasse provenienti da animali le cui condizioni igieniche della cute non siano idonee alla macellazione. Attraverso la nostra esperienza, la classificazione degli animali in base al grado di pulizia della cute, ha permesso di organizzare in modo logistico la macellazione dei soggetti, tramite l'adozione di misure correttive quali, la macellazione a fine giornata degli animali più contaminati, il rallentamento della linea di lavorazione, l'aumento dello spazio di

separazione tra soggetti contigui etc.; consentendo di limitare, per quanto possibile, l'ingresso di eventuali fonti di contaminazione nelle aree adibite alla macellazione.

Gli interventi attuabili allo scopo ottenere soggetti che vengano avviati al macello in condizioni igieniche idonee sono numerosi e possono intervenire in più punti della catena produttiva.

## **Allevamento**

I risultati di uno studio condotto dall'Institut de l'Élevage di Parigi hanno dimostrato che il grado di pulizia del mantello dei bovini è la risultante di un certo numero di fattori legati alla stabulazione dell'animale ed alla sua alimentazione, fattori questi che agiscono spesso in interazione tra di loro (Institut de l'Élevage, 2007).

A livello di allevamento è necessario intervenire soprattutto sugli elementi che risultano determinanti al fine di garantire la salute e il benessere degli animali; a partire da una corretta alimentazione nel periodo del finissaggio fino regimi alimentari con elevato tenore di fibra e sostanza secca, che evitino bruschi cambi nella composizione della razione e favoriscano la produzione di feci più consistenti (Institut de l'Élevage, 2007).

Una particolare attenzione va posta alla cura dei ricoveri: buona ventilazione, drenaggio adeguato, lettiera in paglia regolarmente rinnovata, strutture per la pulizia e l'abbeverata correttamente concepite al fine di evitare l'accumulo di liquami, densità d'occupazione dei box idonee, sono tutti fattori che aiutano a contenere le

contaminazioni sulla cute degli animali (FSA, 2004; AFSCA, 2006; Institut de l'Élevage, 2007) . Così come vigilare attentamente sullo stato sanitario dei capi e adottare misure profilattiche nei confronti degli endo ed ecto-parassiti e l'adozione di piani di vaccinazione per la prevenzione delle infezioni da agenti patogeni.

Nel determinare la pulizia degli animali, al di là del tipo di stalla e della razione utilizzata, resta comunque determinante il ruolo giocato dall'allevatore soprattutto in riferimento agli interventi nelle aree di riposo e di esercizio (Institut de l'Élevage, 2007).

### **A livello commerciale**

Adottare strategie di acquisto degli animali destinati alla macellazione in funzione dell'aspetto "pulizia cute/vello". In alcuni Paesi esiste un vero e proprio sistema di declassamento della carne e delle pelli derivate da animali che giungono al macello in condizioni igieniche non adeguate (Institut de l'Élevage, 2005). Oltralpe sono attivi veri e propri regimi sanzionatori, che attribuiscono le responsabilità agli operatori della produzione primaria di costi aggiuntivi ed eventuali interventi correttivi effettuati sulla cute degli animali prima della macellazione, (FSA, 2004).

### **A livello di trasporto**

Il trasporto dei bovini verso il macello esercita una notevole influenza nel determinare il passaggio tra un soggetto e l'altro di microrganismi patogeni (Dewell *et al.*, 2008).

Vigilare affinché gli animali siano caricati e scaricati asciutti. Utilizzare veicoli ben ventilati e rispettare la densità di carico consentita. Ripulire e disinfettare il pavimento dopo ogni carico e ricoprire il pavimento con lettiera fresca e pulita, sono tutti elementi indispensabili a garantire l'igiene degli animali e il rispetto delle norme sulla protezione degli animali.

## **A livello di macello**

E' ormai assodato che la macellazione rappresenta la fase che riveste maggior influenza sulla qualità microbiologica delle carni (Dennai *et al.*, 2001). La cute contaminata rappresenta un potenziale pericolo per la sicurezza delle carni in quanto, durante il processo di rimozione delle pelli, è difficile contenere il trasferimento di microrganismi patogeni verso la carcassa (Barkocy-Gallagher *et al.*, 2003). Il responsabile del macello e il veterinario ufficiale devono allora intervenire a questo livello ponendo in essere tutta una serie di azioni utili a limitare i danni derivanti da una possibile contaminazione, applicando rigorosamente di buone pratiche di igiene soprattutto durante le fasi di scuoiamento, iugulazione ed eviscerazione. Considerare l'accettazione degli animali come un CCP, può rappresentare un sistema per controllare l'ingresso di microrganismi patogeni nei locali di macellazione, così come la macellazione logistica degli animali in funzione dello stato di pulizia della loro cute (Liuzzo *et al.*, 2007).

Predisporre stalle di sosta adeguate, facili da pulire e disinfettare, dotate di ventilazione adeguata per favorire la traspirazione della cute degli animali. Dotare le

stalle di un efficiente sistema di scolo delle acque. Evitare in ogni caso l'utilizzo dell'acqua per eliminare la contaminazione visibile durante la catena di macellazione. Consentire solo il taglio e l'asportazione della parte contaminata. Se del caso ripulire gli animali, rasare la zona insudiciata oppure lavare ed asciugare accuratamente. Sono tutte attività che consentono di migliorare le condizioni igieniche degli animali e che garantiscono il rispetto delle norme basilari sul benessere degli animali anche in questa questo livello della catena produttiva, in cui spesso tali condizioni vengono ignorate.

Per quanto riguarda le azioni da applicare una volta che gli animali siano stati macellati; attualmente la normativa comunitaria impone alle industrie alimentari il rispetto di buone prassi igieniche "dal produttore al consumatore", al fine di garantire che gli alimenti di origine animale non contengano microrganismi patogeni. A eccezione del lavaggio con acqua delle carcasse, le buone prassi igieniche non possono essere sostituite da trattamenti di decontaminazione; questi ultimi vanno presi in considerazione soltanto se la sicurezza e l'efficacia di una data sostanza siano state dimostrate (EFSA, 2008).

D'altra parte l'operatore del settore alimentare che gestisce il macello ha l'obbligo di applicare le correzioni, ossia le azioni volte ad eliminare la non conformità "sporizia"; nello specifico deve garantire che qualora la pelle ed il vello siano in condizioni da presentare un rischio inaccettabile di contaminazione delle carni, deve provvedere a ripulirli. Dagli schemi proposti dalle diverse "agenzie per la sicurezza degli alimenti" risulta evidente che i soggetti classificati nelle categorie "sporche" non possono essere macellati se non dopo aver subito un trattamento di pulizia.

Recentemente Small *et al.* (2005), hanno passato in rassegna e sperimentato diversi sistemi di pulizia della pelle mediante l'impiego di acqua, acqua e detergente, acqua e disinfettante o con asportazione meccanica mediante taglio, taglio più flambatura. Tutti i sistemi sperimentati hanno ragione dello sporco cd. fresco e comunque non producono un effetto significativo di decontaminazione. Fra tutti quello risultato più efficace in termini di riduzione logaritmica della contaminazione microbica è il taglio (rasatura) seguito da flambatura della superficie. Nell'ambito dei cd. trattamenti liquidi il più efficace è risultato il metodo con l'impiego di betane plus, sanificante a base di Sali quaternari di ammonio. Interessante il risultato sull'impiego solo ed esclusivo della rimozione meccanica dello sporco con acqua, tale trattamento non solo non ha effetti di decontaminazione ma addirittura comporta un aumento della contaminazione (Byrne *et al.*, 2000; Mies *et al.*, 2004; Carlson *et al.*, 2008). Esistono comunque diverse ragioni per preferire, nei bovini, la decontaminazione del mantello prima dello scuoiamento: si riduce il numero dei batteri introdotti lungo la linea di macellazione (Barkocy-Gallagher *et al.*, 2003; Nou *et al.*, 2003; Arthur *et al.*, 2004; Bosilevac *et al.*, 2004a), si possono utilizzare numerose sostanze poiché la pelle bovina non è un alimento, inoltre, alla decontaminazione del mantello prima dello scuoiamento si può aggiungere la decontaminazione delle carcasse finite. Compito del veterinario ufficiale, quindi dell'Autorità Competente, verificare, come indicato dalla Commissione Europea, che le procedure di pulizia sviluppate siano condotte in modo adeguato (Liuzzo *et al.*, 2008).

In ogni caso il regolamento (CE) n. 853/2004 ammette l'impiego di trattamenti di decontaminazione a integrazione delle buone prassi igieniche, il tutto subordinato

dall'utilizzo di trattamenti di decontaminazione autorizzati. Nell'unione Europea, attualmente, non esistono trattamenti di decontaminazione autorizzati, pur essendo tale pratica ammessa in vari paesi terzi. Tutti i processi di decontaminazione di cute e carcassa precedentemente illustrati si sono dimostrati capaci di ridurre il livello delle contaminazioni e quindi incrementare il livello di sicurezza delle carni, ma nessuno dei metodi preventivamente descritti risulta in grado di eliminare totalmente la presenza di microrganismi patogeni dalla superficie delle carni.

Nell'UE, l'uso di una sostanza chimica è soggetto a verifica preventiva delle autorità preposte alla gestione del rischio circa la comprovata sicurezza ed efficacia in termini di sensibile riduzione della contaminazione microbica. Le autorità comunitarie sono inoltre tenute a sorvegliare lo sviluppo di eventuali microrganismi resistenti a tali sostanze chimiche in conseguenza del loro impiego (EFSA, 2008). Sarebbe interessante valutare, anche a livello di macello, l'applicazione di sistemi di decontaminazione come l'EO water, che hanno dimostrato possedere un buon potere decontaminante e allo stesso tempo presentano un buon margine di sicurezza per salute del consumatore (Bosilevac *et al.*, 2005).

Nel 2006 il gruppo di esperti scientifici sugli additivi alimentari, gli aromatizzanti, i coadiuvanti tecnologici e i materiali a contatto con gli alimenti (AFC) e il gruppo sui pericoli biologici (BIOHAZ) dell'EFSA, hanno presentato una guida tecnica (AFSA, 2006) per le industrie contenente i dati necessari per dimostrare la sicurezza e l'efficacia dei trattamenti decontaminanti. L'EFSA ha esaminato varie sostanze usate in paesi terzi per la decontaminazione delle carcasse di pollame. Il lavoro si è concentrato in

particolare su: biossido di cloro, cloruro di sodio acidificato, fosfato trisodico e perossiacidi.

Un [parere del gruppo BIOHAZ](#) (EFSA, 2008) ha esaminato l'eventuale sviluppo di resistenza antimicrobica collegata alle stesse quattro sostanze usate per decontaminare le carcasse di pollame, concludendo che: non sussistono dati idonei a dimostrare che l'uso di tali sostanze possa indurre una maggiore tolleranza dei batteri o una maggiore resistenza ad altri agenti antimicrobici. Esistono tuttavia prove indicanti una tolleranza batterica verso sostanze antimicrobiche o biocidi diversi da quelli considerati nel parere. Fatto questo che fa ben deporre verso un parere favorevole alla sperimentazione di nuovi prodotti anche per la decontaminazione delle carcasse di grossi ungulati domestici.

In ogni caso a nostro parere, considerando che le successive manipolazioni cui verranno sottoposte le carcasse (disosso, sezionatura e altre attività), possono rappresentare un ulteriore fonte di contaminazione per le carni (Logue *et al.*, 2005), è dunque necessario intervenire nel limitare quanto più possibile le eventuali contaminazioni che possono verificarsi all'inizio del processo di produzione.

Sensibilizzare tutti gli operatori della filiera sull'importanza che riveste ciascuna fase del processo produttivo nel determinare le qualità microbiologiche del prodotto: impedendo l'arrivo al macello di animali le cui condizioni igieniche possano rappresentare un rischio per le fasi successive di lavorazione; applicare "strumenti correttivi" (es. lavaggio della cute con soluzioni disinfettanti, macellazione logistica dei soggetti in base al grado di pulizia) e l'utilizzo di eventuali metodi di decontaminazione delle carcasse, rappresentano insieme a mezzi quali l'applicazione del piano Haccp,

delle corrette prassi igieniche e di lavorazione e la formazione del personale, le attività a disposizione di ciascun operatore, per limitare il più possibile l'arrivo sulle tavole dei consumatori di carni potenzialmente nocive.

Concludendo, risulta innanzitutto opportuno e necessario che, anche in ambito nazionale, le autorità preposte stabiliscano quali strumenti mettere a disposizione dell'operatore del settore alimentare e del controllo ufficiale al fine di codificare e rendere omogeneo un sistema di giudizio sul grado di pulizia dei bovini presentati alla macellazione. A tal proposito il nostro lavoro si sta indirizzando alla predisposizione di una linea guida che consenta la facile applicazione anche nel nostro Paese del sistema di classificazione degli animali in base al livello di pulizia della cute.

L'applicazione su scala nazionale della valutazione del grado di pulizia consentirebbe la raccolta di dati necessari ed indispensabili per proporre ed imporre le azioni correttive conseguenti, nello spirito dei regolamenti comunitari, alla gestione del rischio di contaminazione microbiologica che l'insudiciamento della cute degli animali determina (Liuzzo *et al.*, 2008). Alla luce di ciò *"i trattamenti antimicrobici devono essere presi in considerazione unicamente alla stregua di misure integrative per ridurre la carica batterica delle carcasse, nel contesto di un programma di controllo pienamente integrato, applicato a tutta la filiera alimentare"* (EFSA, 2008).

## BIBLIOGRAFIA

- Aberle E.D., Forrest J.C., Gerrard D.E., Mills E.W., Hedrick H.B., Judge M.D., and Merkel R.A. (2001). Conversion of muscle to meat and development of meat quality. In Principle of Meat Science, 4<sup>th</sup> Edition. Pp. 83 – 108, Kendall Hunt, Dubuque, IA.
- AFSSA, Agence Francaise de Sècuritè Sanitaire des Aliments. (Giugno 2007). Saisine n° 2006-SA-0261.
- Agence Fèdèrale pour la Sècuritè de la Chaine Alimentaire Belga (AFSCA) (2006) – Bon Etat des Toisons pour des viandes sures. Editeur Responsable : Gil Houins. Bruxelles. D/2006/10413/2.
- Ayebah B., Hung Y.C., Frank C.S. J.F. (2005). Enancing the bactericidal effect of oxidizing water on *Listeria monocytogenes* biofilms formed on stainless steel. Journal of Food Protection. 68, 7: 1375 – 1380.
- Alonso S., Mora A., Blanco M., Blanco J. E., Dahbi G., Ferreiro M.T., López C., Alberghini L., Albonetti S., Echeita A., Trevisani M., Blanco J., (2007). Fecal carriage of *Escherichia coli* O157:H7 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. International Microbiology.10, 109 – 116.
- Arthur T.M., Wheeler T.L. Shackeloford S.D., Bosilevac J.M., Nou X. and Koohmaraie M. (2005). Effects of low-dose, low-penetration electron beam irradiation of chilled beef carcass surface cuts on *Escherichia coli* O157:H7 and meat quality. Journal of Food Protection. 68, 666-672.
- Arthur T.M, Bosilevac J.M., Nou X., Shackelford S.D., Wheeler T.L., Kent M. P., Jaroni D., Pauling B., Allen D.M., and Koohmaraie M. (2004). *Escherichia coli* O157 :H7 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, and *Escherichia coli* O157 at varius step in commercial beef proressing plant. Journal of food Protection. 67, 658-665.
- Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) (2008). Assessment of the possible effect of the four antimicrobial treatment substances on the emergence of antimicrobial

resistance - Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. The EFSA Journal (2008) 659, 1-26.

Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) (2008). Decontaminazione delle carcasse. [http://www.efsa.europa.eu/EFSA/KeyTopics/efsa\\_locale-1178620753820\\_Decontaminationofcarcasses.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/KeyTopics/efsa_locale-1178620753820_Decontaminationofcarcasses.htm) (ultimo accesso novembre 2008).

Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) (2006). Guidance document on the safety and the efficacy of substances for the removal of microbial surface contamination of foods of animal origin. The EFSA Journal (2006) 388, 1-9.

Bacon R.T., Belk K. E., Sofos J.N., Clayton R.P., Reagan J.O., e Smith G.C. (2000). Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plant employing multiple-sequential intervention for decontamination. Journal of Food Protection. 63, 1080-1086.

Barkocy-Gallagher G.A., Arthur T. M., Rivera-Betancourt M., Nou X., Shackelford S.D., Wheeler T.L., Koohmaraie M. (2003). Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. Journal of Food Protection. 66, 1978-1986.

Bastien D., Lucbert J., Cartier P. (2006). La propreté des bovines à l'abattoir: état des lieux de la situation, facteur explicatifs et outil de notation. Renc. Rech. Ruminants, 13, 317-320.

Bell, R. G. (1997). Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. Journal of Applied Microbiology. 82, 292-300.

Belk K.E., (2001). Beef decontamination technologies. National Cattlemen's Beef Association. <http://www.beef.org/documents/ACFFC.pdf>

Biss M. E., Hathaway S. C. (1998). A HACCP-based approach to hygienic slaughter and dressing of lamb carcasses. New Zealand Veterinary Journal. 46, 5: 167-172.

Byrne C.M, Bolton D.J., Sheridan J.J., McDowell D.A., and Blair S. (2000). The effects of preslaughter washing on the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 transfer from cattle hides to carcasses during slaughter. Letters in Applied Microbiology. 30, 142-145.

- Bosilevac J.M., Nou X., Osborn M.S., Allen D.M. and Koohmaraie M. (2005a). Development and evaluation of an on-line hide decontamination procedure for use in a commercial beef processing plant. *Journal of Food Protection*. 68, 265-272.
- Bosilevac J. M., Shackelford S.D., Brichta D. M., Koohmaraie M. (2005b). Efficacy of ozonated and electrolyzed oxidative waters to decontaminate hides of cattle before slaughter. *Journal of Food Protection*. 68, 7: 1393 – 1398.
- Bosilevac J.M., Arthur T.M., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Rossman M., Reagan J.O., Koohmaraie M. (2004a). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and levels of aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* are reduced when hide are washed and treated with cetylpyridinium chloride at a commercial beef processing plant. *Journal of Food Protection*. 65, 646-650.
- Bosilevac J.M., Wheeler T.L., Rivera-betancourt M., Nou X., Arthur T.M., Shackelford S.D., Kent M.P., Jaroni D., Osborn M.S., Rossman M. (2004b). Protocol for evaluating the efficacy of cetylpyridinium chloride as a beef hide intervention. *Journal of Food Protection*. 67, 303-309.
- British Meat Hygiene Service (1997). Clean Livestock Policy.
- Carlson B.A., Geornaras I., Yoon Y., Scanga J.A., Sofos J., Smith G.C., Belk K.E. (2008). Studies to evaluate chemicals and conditions with low-pressure application for reducing microbial counts on cattle hides. *Journal of Food Protection*. 71,1343-1348.
- Casadiegos P., Cuartas R., Mercado M., Diaz M., Carrascal A. K. (2005). Effectiveness of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Listeria monocytogenes* in lettuce. *Revista de la Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana*. Vol 10 (1) 97-108.
- Chapman P.A., Siddons C.A., Cerdan Malo A.T. and Harkin M.A. (1997). A 1-year study of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle, sheep, pig and poultry. *Epidemiology and Infection*. 119, 245-250.
- Cartier P., (2004). Points de repères en matière de qualité microbiologique viandes bovines (2004). Congrès - Journées des sciences du muscle et technologies des viandes N°10,

Rennes , FRANCE (25/10/2004) 2004, n° OCT, HS (192 p.) [Document : 5 p.] (20 ref.), pp. 175-179

Cartier P. (1997). Le point sur de la qualité microbiologique de la viande bovine. Collection Interbev « le point sur ».

Cartier P. (1994). Utilisation de l'état de propreté des gros bovins comme indicateur de la charge microbienne de leur cuir. Viandes et produits carnés . vol. 15, n°4, pp. 119-122 (1 ref.)

Code of Federal Regulations (CFR) (2005a). Acidified sodium chlorite solutions. Code of Federal Regulations. 21 CFR 173.325: 140-142.

Code of Federal Regulations (CFR) (2005b). Animal and animal Products: Contamination of carcasses organs, or other parts. Code of Federal Regulation. 9 CFR 310.18: 125-126.

Code of Federal Regulations (CFR) (2005c). Ionizing radiation for the treatment of food. Code of Federal Regulation. 21 CFR 179.26: 451-453.

Codex Alimentarius Commission, (2005), Code d'usages en matière d'hygiène pour la viande, CAC/RCP 58-2005, 1-55.

Colavita Giampaolo (2008). Igiene e Tecnologie degli Alimenti di Origine Animale. Le point Vétérinaire Italie.

Collis V. J., Davies M. H., Hutchison M. L., Buncic S., Reid C. A. Synge B. A. and Lyne A. R. (2003). Source and spread of particulate and bacterial contamination between cattle during the farm to abattoir phase of production. Food Standard Agency. Project M01009 – Final Report.

Commissione Europea – Direzione Generale della Salute del consumatore, Linee guida sull'applicazione di alcune disposizioni del Regolamento (CE) n. 853/2004 relativo all'igiene degli alimenti di origine animale, Bruxelles, 21 dicembre 2005.

- Confédération Nationale de l'Elevage (2007). Charte de Bonnes Pratique en Elevage. Version 2007.
- Cray J.W.C. and Mood H.W. (1995). Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 1586-1590.
- Crozier-Dodson B. (2000). Combined treatment of 2% lactic acid (80 °C), and microwaves for the reduction of natural microflora and *Escherichia coli* O157:H7 on vacuum packaged beef subprimals. MS Thesis, Hale Library, Kansas State University, Manhattan, KS.
- Cutter C.N., Dorsa W.J and Siragusa G.R. (1997). Parameters affecting the efficacy of spray washes against *Escherichia coli* O157:H7 and fecal contamination of beef. *Journal of Food Protection*. 61, 466-470.
- Davies, M. H., Hadley P. J., Stosic P. J., and Webster S. D. (2000). Production factors that influence the hygienic condition of finished beef cattle. *The Veterinary Record*. 146,179-183.
- Dennaï N., Kharrati B. El Yachioui M. (2001). Appréciation de la qualité microbiologique des carcasses de Bovins fraîchement abattus. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 145, 270-274.
- Decreto Legislativo 6 novembre 2007, n. 193, "Attuazione della direttiva 2004/41/CE relativa ai controlli in materia di sicurezza alimentare e applicazione dei regolamenti comunitari nel medesimo settore". *Gazzetta Ufficiale* n. 261 del 9 novembre 2007 – S. O. n. 228.
- Decreto Legislativo 18 aprile 1994, n. 286 - Attuazione delle direttive 91/497/CEE e 91/498/CEE concernenti problemi sanitari in materia di produzione ed immissione sul mercato di carni fresche. (G.U. n. 111 S.O., 14 maggio 1994).
- Department of Agriculture – Food Safety and Inspection Service (DA-FSIS) (1996). Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule. 9 CFR, Part 304.

- Dewell G.A., Simpson C.A., Dewell R.D., Hyatt D.R., Belk K.E., Scanga J.A., Morley P.S., Grandin T., Smith G.C., Dargatz D.A., Wagner B.A., Salman M.D. (2008). Impact of Transportation and Lairage on Hide Contamination with *Escherichia coli* O157 in finished beef cattle. *Journal of Food Protection*. 71, 1114-1118.
- Dickison J.S., Nettles C.G., and Siragusa G.R. (1994). Antimicrobial effects of trisodium phosphate against bacteria attached to beef tissue. *Journal of Food Protection*. 57, 952-955.
- Direttiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 19 novembre 2003; sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifiche della decisione 90/424/CEE del Consiglio che abroga la Direttiva 92/117/CEE del Consiglio.
- Edwards J.R., Fung D.Y.C. (2006). Prevention and decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 on raw beef carcasses in commercial beef abattoirs. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 14, 1-95.
- Elder R.O., Keen J.E., Siragusa, G.R., Barkocy-Gallagher G.A., Koohmaraie M. and Laegreid W.W. (2000). Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proceedings of the National Academies of Sciences*. 97, 2999-3003.
- Enter-net Italia. Rete Internazionale di Sorveglianza per le infezioni Enteriche da Salmonella e da VTEC O157. [http://www.simi.iss.it/enternet/dati\\_seu.asp](http://www.simi.iss.it/enternet/dati_seu.asp) (ultimo accesso novembre 2008).
- European Commission - The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) - Annual Report (2007). Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. 2007 — 65 pp. ISBN 978-92-79-08594-9. DOI 10.2772/63727
- European Food Safety Authority. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. (2007) *The EFSA Journal*, 130.

- Fabrizio K. A., Cutter C. N. (2004). Comparison of electrolyzed oxidizing water with other antimicrobial interventions to reduce pathogens on fresh pork. *Meat Science*. 68, 463-468.
- Fabrizio K.A., Cutter C.N. (2003). Stability of electrolyzed oxidizing water and its efficacy against cell suspension of *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 66, 1379-1384.
- Fabrizio K. A., R. R Sharma, A. Demirci C. N. Cutter (2002). Comparison of electrolyzed oxidizing water with various antimicrobial interventions to reduce *Salmonella* species on poultry. *Poultry Science*. 81, 1598 – 1605.
- Faith N.G., Shere J.A., Brosch R., Arnold K.W., Ansay S.E., Lee M.S., Luchansky J.B. and Kaspar C.W. (1996). Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 1519-1525.
- Fallon R.J., Lenehan J.J. Factor affecting the cleanliness of cattle housed in buildings with concrete slatted floors. *Beef Production Series N*. 47.
- Fang T.J., and Tsai H.C. (2003). Growth patterns of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef treated with nisin, chelators, organic acids and their combinations immobilized in calcium alginate gels. *Food Microbiology*. 20, 243-253.
- Food Safety and Inspection Service (FSIS) (2002). Backgrounder: new measures to address *E. coli* O157:H7 contamination. USDA FSIS. <http://www.fsis.usda.gov/OA/background/ec0902.pdf> (Ultimo accesso novembre 2008).
- Food Standard Agency (FSA) (2004a). *Red Meat Safety & Clean Livestock*. Published by the Food Standard Agency June 2002 (Reprinted March 2004), Crown Copyright 2002, Printed in England 2K FSA/0595/0602.
- Food Standard Agency (FSA) (2004b). *Clean Beef Cattle for slaughter. A guide for producers*. Published by the Food Standard Agency November 2004, Crown Copyright 2004, Printed in England 5k FSA/0951/1104.
- Fournaud J. (1982). Contamination aux différents stades. In « Hygiène et technologie de la viande fraîche ». Edition du CNRS.

- Fournaud J. (1978). Filière viande, 3, 15 – 20.
- Fung, D.Y.C., M.N. Hajmeer, C.L. Kastner, J.J. Kastner, J.L. Marsden, K.P. Penner, R.K. Phebus, J.S. Smith and M.A. Vanier. (2001). "Meat Safety" in Meat Science and Applications, Rogers, R. (ed.), Marcel Dekker Inc., New York, Chapter 8:171-205.
- Gansheroff, L. J. & O'Brien, A. D. (2000). *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle presented for slaughter in the U.S.: higher prevalence rates than previously estimated. The Proceedings of the National Academy of Science online (USA). 97, 2959-2961.
- Gill C.O., Penney N. and Nottingham P.M. (1978). Tissue sterility in uneviscerated carcasses. Applied and Environmental Microbiology. 36, 356 – 359.
- Gill C.O., Penney N. and Nottingham P.M. (1976). Effect of delayed evisceration on the microbial quality of meat. Applied and Environmental Microbiology. 31, 465 – 468.
- Gorman B.M., KoChevar S.L., Sofos J.N., Morgan J.B., Schmidt G.R., Smith G.C., (1997). Changes of beef adipose tissue following decontamination with chemical solutions or water of 35 °C or 74 °C. Journal of Muscle Foods. 8, 185-197.
- Guerini M.N., Harhay D.M., Shackelford S.D., Arthur T.M., Bosilevac J.M., Kalchayanand N., Wheeler T.L., Koohmaraie, M. (2007). *Listeria* prevalence and *Listeria monocytogenes* serovar diversity at cull cow and bull processing plants in the United States. Journal of Food Protection. 70(11), 2578-2582.
- Haas N.C., (2001). Decontamination using chlorine dioxide: hearing on the decontamination of anthrax and biological agents. U.S. House of Representative Committee on Science. <http://www.house.gov/science/full/nov08/haas.htm>.
- Hancock D.D., Rice D.H., Thomas L.A., Dragatz D.A. and Besser T.E. (1997). Epidemiology of *Escherichia coli* O157 in Feedlot cattle. Journal of Food Protection. 60, 462-465.
- Hardin M.D., Acuff G.R., Lucia L.M., Oman J.S., and Savell J.W. (1995). Comparison of methods for decontamination from beef carcass surface. Journal of Food Protection. 58, 368-374.

- Huffman R.D. (2002). Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. *Meat Science*. 62, 285-294.
- Hulebak K.L., and Schlosser W. ( 2002). Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) History and Conceptual Overview. *Risk Analysis*. 22, 547-552.
- Institut de l'Élevage – Lucbert J., Cartier P., Gueguen L. (2005). Etat de Lieux de la propreté des bovins à l'entrée de l'abattor. Compe –rendu final N°17 0632022. Septembre 2005.
- Institut de l'Élevage – Bastien D., Cartier P., Lucbert J. (2006). Grille de natation de la propreté des bovins vivants. Compe – rendu final N°17 0632005. Février 2006.
- Institut de l'Élevage – Bastien D., Gueguen L. (2007). Propreté des cuis de bovins – Indentification des principaux facteurs d'élevage en relation avec la propretè. Compe – rendu final N° 170632022. Mars 2007.
- International standard: ISO 4120: Sensory analysis – Methodology – Triangle test, 2004 (ISO 4120:2004(E)).
- Izumi H. (1999). Electrolyzed water as disinfectant for fresh cut vegetables. *Journal of Food Science*. 64, 3: 536 – 539.
- Johanson L., Underdal B., Grosland K., Whelehan O.P., and Roberts T.A. (1983). A Survey of the hygienic quality of beef and pork carcasses in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 25, 1-13.
- Kim C., Hung Y. C., Brasckett R.E. (2000). Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of food-borne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. 61, 199-207.
- Koohmaraie M.\*, T.M. Arthur, J.M. Bosilevac, M. Guerini, S.D. Shackelford, T.L. Wheeler. (2005). Post- harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. *Meat Science*. 71, 79-91.
- Kozempel M., Goldberg N., and Craig J.J. C., (2003). The vacuum/stream/vacuum process. *Food Technology*. 57 (12), 30-33.

- Lim K., and Mustapha A. (2004). Effects of cetylpyridium chloride, acidified sodium chloride, and potassium sorbate on populations of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* on fresh beef. *Journal of Food Protection*. 67, 310-315.
- Liu C., Duan J., Su Y.C. (2005). Effect of electrolyzed oxidizing water on reducing *Listeria monocytogenes* contamination on seafood processing surfaces. *International Journal of Food Microbiology*. 86, 231 – 237.
- Liuzzo G., Rossi R., Coccollone A., Riu R. (2008). Applicazione pratica di uno strumento di valutazione del grado di pulizia di bovini presentati al macello. *Atti XVIII convegno AIVI*.
- Liuzzo G., Poeta A., Bentley S., (2007). Presentazione degli animali alla macellazione: categorizzazione sulla base del grado di pulizia della pelle/vello nella specie bovina. *Atti XVII convegno AIVI*, pp. 331-334.
- Logue C.M., Sheridan J.J., and Harrington D., 2005. Studies of steam decontamination of beef inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and its effect on subsequent storage. *Journal of Applied Microbiology*. 98, 741-751.
- McEvoy J.M., Doherty A.M., Sheridan J.J., Bailey D.G., and McDowell D.A. (2003a). The effects of treating bovine hide with steam at subatmospheric pressure on bacterial numbers and leather quality. *Letters in Applied Microbiology*. 37, 344-348.
- McEvoy J.M., Doherty A.M., Sheridan J.J., Thomson-Cartier F.M., Garvey P., McGuire L., Blair I.S. and McDowell D.A. (2003b). The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir. *Journal of Applied Microbiology*. 95, 256-266.
- McEvoy J.M., Doherty A.M., Sheridan J.J., Blair I.S and McDowell D.A. (2001). Use of steam at sub-atmospheric pressures to reduce *Escherichia coli* O157:H7 numbers on bovine hide. *Journal of Food Protection*. 64, 1655-1660.
- McEvoy, J. M., Doherty A. M., Finnerty M., Sheridan J. J., McGuire L., Blair I. S., MacDowell D. A., and Harrington D. (2000a.) The relationship between hide cleanliness and bacterial numbers on beef carcasses at a commercial abattoir. *Letters in Applied Microbiology*. 30, 390-395.

- McEvoy, J. M., Doherty A. M., Sheridan J. J., McGuire L. (2000b). Contamination of beef carcasses during hide removal and use of a test bacterial decontamination system on beef hide. Agriculture and Food Development Authority. The National Food Centre. Final Report N. 4577.
- Meat Hygiene Enforcement Report. (1997). Report No 2, pp. 3-4. June, 1997. UK.
- Mies P.D., Covington B. R., Harris K.B., Lucia L.M., Acuff G.R., and Savell J.W. (2004). Decontamination of Cattle Hides Prior to Slaughter Using Washes with and without Antimicrobial Agents. *Journal of Food Protection*. 67, 579-582.
- Nastaijevic I., Mitrovic R., Buncic S. (2008). Occurrence of *Escherichia coli* O157 on hides of slaughtered cattle. *Letters in Applied Microbiology*. 46, 126-131.
- Naidu A.S., (2000). Microbial blocking agents: a new approach to food safety. *Food Technology*. 54 (2) 112.
- Newton, K. G., J. C. L. Harrison, and A. M. Wauter. (1978). Sources of psychrotrophic bacteria on meat at the abattoir. *Journal of Applied Bacteriology*. 45, 75-82.
- Nou X., Rivera-Betancourt M., Bosilevac M.J., Wheeler T.L., Shackelford D., Gwartney B.L., Reagan J.O., Koohmaraie M. (2003). Effect of chemical dehairing on the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and the levels of aerobic bacteria and Enterobacteriaceae on carcasses in a commercial beef processing plant. *Journal of Food Protection*. 66, 2005-2009.
- O'Hanlon K.A., Catarama T.M., Duffy G., Blair I.S., McDowell D.A. (2004). RAPID detection and quantification of *E. coli* O157/O26/O111 in minced beef by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 5,1013-23.
- Olsen D. (2004). Food Irradiation Update. Presented at the Meat Industry Reserch Conference, 1-28.

- Park C.M., Hung, Y.C. Lin C.S., Brackett R. (2005). Efficacy of electrolyzed oxidizing water in inactivating *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on shell eggs. *Journal of Food Protection*. 68, 5: 986 – 990.
- Park H., Hung Y.C., Brakett R.E. (2002a). Antimicrobial effect of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing. *International Journal of Food Microbiology*. 72, 77 – 83.
- Park H., Y.C. Hung, C. Kim. (2002b) Effectiveness of electrolyzed oxidizing water for as a sanitizer for treating different surfaces. *Journal of Food Protection*. 65, 8: 1276 – 1280.
- Prasai R.K., Phebus R.K., Garcia Zepeda C.M., Kastner C.L., Boyle A.E. and Fung D.Y.C. (1995). Effectiveness of trimming and/or washing on microbiological quality of beef carcasses. *Journal of Food Protection*. 58, 1114-1117.
- Ransom J.R., Belk K.E., Sofos J.N., Stopforth J.D., Scanga J.A., Smith G.C. (2003). Comparison of intervention technologies for reducing *Escherichia coli* O157:H7 on beef cuts and trimmings. *Food protection Trends*. 23, 24-34.
- 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.
- Regolamento (CE) n. 854/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano.
- Regolamento (CE) n. 1/2005 del Consiglio, del 22 dicembre 2004 sulla protezione degli animali durante il trasporto e le operazioni correlate che modifica le direttive 64/432/CEE e 93/119/CE e il regolamento (CE) n. 1255/97.
- Renter D.G., Sargeant J.M. (2002). Eterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 epidemiology and ecology in bovine production environments. *CAB international – Animal Health Research Reviews* 3(2) ; 83-94.

- Reid, C.-A., A. Small, S. M. Avery, and S. Buncic. (2002). Presence of food-borne pathogens on cattle hides. *Food Control*. 13:411-415.
- Restaino L.E., Frampton E.W., Hemphill J.B., Palnikar P. (1995). Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 3471-3475.
- Retzlaff D., Phebus R., Nutsch A., Riemann J., Kastner C., and Maesden J. (2004). Effectiveness of a laboratory-scale vertical tower static chamber steam pasteurization unit against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria innocua* on prerigor beef tissue. *Journal of Food Protection*. 67, 1630-1633.
- Rice E.W., Clark R.M., and Johnson C.H. (2003). Chlorine inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. CDC Emerging Infectious Diseases. <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol5no3/rice.htm>
- Rice E.W., Ebel E.D., Hancock D.D., Besser T.E., Herriott D.E. and Carpenter L.V. (1997). *Escherichia coli* O157:H7 in cull dairy cows at farm and at slaughter. *Journal of Food Protection*. 60, 1386-1387.
- Rondanelli E.G., Fabbri M., Marone P. (2005). "Trattato sulle infezioni e tossinfezioni alimentari". Ed. Selecta Medica, 303-318.
- Rivera-Betancourt M., Shackelford S., Arthur T., Westermoreland K., Bellinger G., Rossman M., Reagan J., Koohmaraie M. (2004). Prevalence of *Escherichia coli* O157:h7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. *Journal of Food Protection*. 67, 295-302.
- Rosset R. (1982). Etat des animaux avant abattage. In « Hygiène et technologie de la viande fraîche ». Edition du CNRS.
- Rosset R. et Liger R. (1982). Nature des porteurs de germes. In « Hygiène et technologie de la viande fraîche ». Edition du CNRS.

- Samelis J., Sofos J.N., Kendall P.A., and Smith G.C. (2001). Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium DT 104, and *Listeria monocytogenes* in fresh meat decontamination fluids at 4 and 10 °C. *Journal of Food Protection*. 64, 950-957.
- Savell J.W., Mueller S.L., Baird B.E., (2005). The chilling carcasses. *Meat Science*. 70, 449-459.
- Serraino A., Veronese G., Matera R., Lugoboni B., Pallotti A., Alonso S., Rosmini R. (2006). Efficacia dell'acqua ossidante elettrolizzata per la disinfezione di superfici destinate a venire a contatto con alimenti. Atti del XVI Convegno Nazionale Associazione Italiana Veterinari Igienisti, pp 278-283.
- Sharma R. R., Demirci A. (2003). Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated alfalfa seeds and sprouts with electrolyzed oxidizing water. *International Journal of Food Microbiology*. 86, 231 – 237.
- Shin J., Chang S. and Kang D. (2004). Application of antimicrobial ice for reduction of foodborne pathogens (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*) on the surface of fish. *Journal of Applied Microbiology*. 97, 916-922.
- Shin K., Yamauchi K., Teraguchi S., Hayassaw H., Tomita M., Otsuka Y., Yamazaki S. (1998). Antibacterial activity of bovine lactoferrin and its peptides against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. 26, 407-411.
- Shun-Yao H. (2005). Effects of flow rate, temperature and salt concentration on chemical and physical properties of electrolyzed oxidizing water. *Journal of Food Engineering*. 66, 171-176.
- Small A., Wells-Burr B., Buncic S., (2005). An evaluation of selected methods for the decontamination of cattle hides prior to skinning. *Meat Science*. 69, 263-268.
- Sofos J.N., Belk K.E., and Smith G.C. (1999). Processed to reduce contamination with pathogenic microorganisms in meat. *Con. Meat. Sci. Tech*. 45, 596-605.
- Sofos J.N. and Smith G.C. (1998). Nonacid meat decontamination technologies: Model studies and commercial application. *International Journal of Food microbiology*. 44, 171-188.

- Stan S.D., Daeschel M.A. (2003). Reduction of *Salmonella enterica* on alfalfa seeds with acidic electrolyzed oxidizing water and enhanced uptake of acidic electrolyzed oxidizing water into seeds by gas exchange. *Journal of Food Protection*. 66, 11: 2017 – 2022.
- Stopforth J.D., Yoon Y., Belk K.E., Scanga J.A., Kendall P.A., Smith G.C., and Sofos J.N. (2004). Effect of simulated spray chilling with chemical solutions on acid habituated and non-acid habituated *Escherichia coli* O157:H7 cells attached to beef carcass tissue. *Journal of Food Protection*. 67, 2099-2106.
- Stopforth J.D., Samelis J., Sofos J.N., Kendall P.A., and Smith G.C. (2003). Influence of extended acid stressing in fresh beef decontamination fluids on sanitizer inactivation of acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7 biofilms. *Journal of Food Protection*. 66, 2258-2266.
- United State Department of Agriculture (USDA). Postharvest Food Safety Innovations Improve Beef Safety. *Agricultural Research Magazine* October (2006) - Vol. 54, No. 10.
- United State Department of Agriculture (USDA). Guidance for Minimizing the Risk of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in Beef Slaughter Operations. National Agricultural Library/USDA. September 2002.
- Venkitaanarayanan K., Ezeike G.O., Hung Y.C., Doyle M.P. (1999). Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. Sept. 4276 – 4279.
- Wang G, Clark CG, Rodgers FG. (2002). Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 10, 3613-3619.
- Warriner K., Eveleigh K., Goodmain J., Betts G., Gonzales M., Waits W.M. (2001). Attachment of bacteria to beef from stream pasteurized carcasses. *Journal of Food Protection*. 64, 493-497.

World Health Organization (WHO). (2002). Risk profile for enterohemorrhagic *E.coli* including the identification of the commodities of concern, including sprouts, ground beef, and pork. Codex Alimentarius. <ftp://ftp.fao.org/codex/ccfh35/fh0305de.pdf> (Ultimo accesso novembre 2008).

World Health Organization (WHO). (1997). Prevention and Control of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection. Food Safety Unit: Programme of Food Safety and Food Aid, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Zhao T., Doyle M. P., Shere J. and L. Garber (1995). Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 1290-1293.