

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in:

Disciplina Nazionale ed Europea sulla Produzione ed il
Controllo degli Alimenti di Origine Animale

Ciclo XIV

Valutazione dell'efficacia dei Piani di
Autocontrollo per la gestione dei pericoli
microbiologici nella macellazione suina

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Franco Brindani

Tutor:

Chiar.mo Prof. Silvia Bonardi

Dottorando: Dott. Luca Bassi

Sommario

INTRODUZIONE	4
Il Sistema HACCP	7
I pre-requisiti e i principi generali del Sistema HACCP	8
I requisiti igienici specifici e il sistema HACCP nell'industria delle carni.....	38
La Produzione Primaria	38
Il Trasporto al macello.....	40
La fase di Macellazione	41
Requisiti aggiuntivi per la Macellazione dei suini	47
I Controlli di Processo.....	49
La Verifica dell'efficacia dei controlli di processo	51
Gli Indicatori Microbiologici	54
I Criteri Microbiologici applicabili all'industria di macellazione suina	57
Predisposizione dell'Autocontrollo aziendale nelle industrie di macellazione suine	74
Le informazioni generali propedeutiche al manuale di autocontrollo	75
Le procedure di gestione delle attività produttive (SOP).....	76
Il Sistema HACCP	92
Diagramma di flusso della macellazione suina	99
Andamento delle contaminazioni microbiche lungo le varie fasi della macellazione suina	101
Analisi dei rischi legati alla macellazione suina	106
I Parametri Microbiologici.....	128
<i>Salmonella</i> spp.	131
La classificazione tassonomica	131
Le caratteristiche biochimiche	134
Le caratteristiche colturali.....	136
I fattori di virulenza	138
L'epidemiologia del microrganismo	140
Le forme di malattia nell'uomo	144
L'epidemiologia delle infezioni a trasmissione alimentare	152
<i>Listeria monocytogenes</i>	168
La classificazione tassonomica	168
Le caratteristiche morfologiche e colturali	169

La classificazione antigenica.....	171
Le caratteristiche fisiologiche.....	172
I fattori di virulenza e la patogenesi dell'infezione	174
Le forme di malattia nell'uomo	176
L'epidemiologia del microorganismo	181
L'epidemiologia delle infezioni a trasmissione alimentare	187
I parametri microbiologici d'igiene	190
Monitoraggio delle temperature di raffreddamento post-macellazione attraverso l'impiego della tecnologia IR e valutazione di parametri microbiologici igienico-sanitari	195
- PARTE SPERIMENTALE -	195
Scopo della ricerca	196
Materiali e Metodi	199
Risultati.....	230
Discussione.....	246
Bibliografia	256

INTRODUZIONE

La carne è stata tradizionalmente considerata un veicolo potenziale di un numero significativo di agenti zoonotici a trasmissione alimentare. Sebbene lo spettro delle patologie di interesse per la salute pubblica legate al consumo di carne sia cambiato in relazione all'evoluzione dei sistemi di produzione e di processazione, la persistenza del problema che essi pongono è stata dimostrata negli ultimi anni grazie a programmi di monitoraggio per specifici microrganismi patogeni a trasmissione alimentare come *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Yersinia enterocolitica*. In aggiunta ai pericoli microbiologici, chimici e fisici, nuovi rischi stanno emergendo per il consumatore, come i prioni, agenti dell'enfalepatia spongiforme bovina (BSE). Inoltre, i consumatori hanno generalmente aspettative relativamente a questioni di adeguatezza al consumo, che non sono sempre rilevanti per la salute umana e potrebbero quindi generare una visione distorta della realtà. Pertanto è richiesto un approccio all'igiene delle carni che sia basato su una valutazione del rischio: in questa direzione le misure in materia di igiene dovrebbero essere indirizzate in particolar modo in quei punti della catena alimentare, laddove esse possano essere di maggior rilievo ed efficacia nel ridurre i rischi per i consumatori. Questo dovrebbe trovare riflesso nell'applicazione di misure specifiche, che siano basate su di una valutazione scientifica del rischio, che miri a prevenire e controllare (quindi

gestire) le contaminazioni durante tutti gli aspetti di produzione delle carni e trasformazioni successive. L'applicazione dei principi basati sul metodo HACCP risulta essere uno strumento essenziale. Questo sistema consente di integrare le misure di intervento lungo tutta la catena di produzione degli alimenti a partire dalla produzione primaria fino al consumatore finale, attraverso un flusso continuo di informazioni tra una fase e quella successiva per poter coordinare gli interventi di controllo. Un approccio di questo genere, che considera interconnesse strettamente le varie fasi tra loro e che mira a soddisfare nel complesso i livelli di protezione adeguati per il consumatore finale, è sicuramente più efficace ed economico rispetto alla mera applicazione di misure prescrittive, i cui risultati non sono preventivabili.

A livello nazionale l'Autorità competente, rappresentata dal Ministero della Salute centralmente e dalle Regioni e dalle AUSL a livello locale, concentra la propria attività di controllo e sorveglianza soprattutto negli allevamenti, negli impianti di macellazione oltre che negli stabilimenti di trasformazione, che rappresentano i punti chiave per garantire la sanità animale e per perseguire gli obiettivi di salute pubblica. In particolare è necessario focalizzare l'attenzione alle attività di macellazione, dato che eventuali problemi che si dovessero verificare in questa fase avrebbero delle ripercussioni importanti verso tutte le altre fasi successive. Per la sorveglianza delle zoonosi infatti la visita ispettiva *ante- e post- mortem* ha

un ruolo di primordine nei programmi di sorveglianza nazionali, che includono le zoonosi, come sancito anche dal Decreto Legislativo numero 191 del 2006 (attuazione della Direttiva europea numero 99 del 2003) “sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e dei relativi agenti zoonotici”. In definitiva, a prescindere dalle disposizioni normative, è fondamentale che la Sanità Pubblica e la Sanità Animale non siano viste in dualismo, ma che siano al contrario integrate nelle loro attività ispettive per garantire il perseguimento di entrambi i fini.

Per concludere questa breve introduzione penso che sia importante sottolineare che in un’ottica di gestione del rischio, i principi di sicurezza alimentare debbano essere integrati, dove necessario, durante le fasi di progettazione e di implementazione, nei piani di autocontrollo aziendali del settore delle carni: questo continuo processo di miglioramento è possibile solo attraverso attività di ricerca e sorveglianza epidemiologica, scopo che si vuole in definitiva porre questo studio.

Il Sistema HACCP

**H a z a r d
A n a l y s i s
a n d
C r i t i c a l
C o n t r o l
P o i n t**

I pre-requisiti e i principi generali del Sistema HACCP

I principi generali di igiene alimentare, come espressi dallo specifico Codice del *Codex Alimentarius* (CAC/RPC 1-1969, Rev. 4-2003), fissano basi solide, sulle quali fondare un programma efficace che possa assicurare l'igiene delle sostanze alimentari. Viene infatti sancito il diritto delle persone ad aspettarsi cibi che siano sani e idonei al consumo, concetto che viene ripreso ampiamente anche dai Regolamenti Comunitari a partire dal Regolamento (CE) n.178 del 28 Gennaio 2002 che “stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare”, fino al più recente Regolamento (CE) n. 853 del 29 Aprile 2004 sull'Igiene dei prodotti alimentari. Infatti le malattie a trasmissione alimentare possono creare danni economici e alla salute pubblica rilevanti, con conseguenze anche fatali. Inoltre, il deperimento dei prodotti alimentari è dannoso, costoso e può influenzare negativamente il commercio e la fiducia del consumatore.

I principi generali contenuti in questo codice devono essere utilizzati in unione con i requisiti di corretta prassi igienica contenuti nei codici specifici e, dove necessario, con le linee guida sui criteri microbiologici.

Questi provvedimenti sono applicabili a qualsiasi fase della catena alimentare, a partire dalla produzione primaria fino al consumatore finale, e per ciascuna focalizzano i mezzi di controllo chiave per la produzione igienica e sicura degli alimenti, fornendo le condizioni migliori sulle quali fondare un piano di autocontrollo ispirato ai principi del sistema HACCP.

Gli obiettivi del documento sono:

- Indicare i principi essenziali di igiene alimentare trasversali applicabili alle differenti realtà produttive lungo tutta la catena alimentare per ottenere alimenti che siano sicuri e idonei al consumo umano;
- Incentivare un approccio basato sui principi dell'HACCP, come mezzo per aumentare la sicurezza alimentare;
- Spiegare come implementare questi principi;
- Fornire una guida che sia una chiave di lettura per i codici specifici per i vari settori della catena alimentare, per i processi, per le strutture e i requisiti igienici particolari delle diverse aree.

Questo documento ha quindi la duplice funzione di supporto ai governi per ispirare la normativa e le procedure in campo alimentare e di fornire linee guida alle industrie del settore per applicare correttamente le regole di corretta prassi igienica. In particolare i risultati finali che si vorrebbero perseguire possono essere riassunti nei seguenti punti: adeguata protezione dei consumatori dalla malattia e dai danni causati dagli alimenti, fornendo

prodotti che siano sani e idonei al consumo, tenendo in considerazione le classi più vulnerabili della popolazione o le differenti caratteristiche tra gruppi di persone; efficace comunicazione del rischio ai consumatori attraverso programmi di educazione sanitaria da una parte, e dall'altra creazione di un'etichettatura chiara, semplice ed efficace che possa essere facilmente comprensibile. Seguendo questa via è possibile mantenere la fiducia dei consumatori finali sull'idoneità dei cibi e sostenere indirettamente il commercio internazionale.

Il primo gradino percorrendo la catena alimentare è rappresentato dalla produzione primaria, nella quale può risultare difficile l'applicazione dei principi HACCP e di conseguenza è consentita una certa flessibilità, come espresso anche dal Regolamento (CE) 852/2004. Tuttavia è possibile adottare buone pratiche igieniche (GHP), applicabili all'allevamento e all'agricoltura. In linea generale, bisogna evitare di utilizzare aree nelle quali l'ambiente costituisce una minaccia alla sicurezza alimentare, controllare adeguatamente i contaminanti, gli animali infestanti e le malattie che colpiscono piante ed animali, adottare pratiche e misure per garantire che gli alimenti siano prodotti sotto condizioni igieniche consone. L'introduzione di pericoli a questo primo livello della catena alimentare influenzerebbe negativamente tutte le fasi successive e diminuirebbe l'efficacia delle misure di controllo intraprese. Per questi motivi bisogna considerare le possibili fonti di contaminazione provenienti dall'ambiente,

escludendo dalla produzione quelle aree in cui sono presenti sostanze dannose oltre limiti accettabili. In un secondo momento, attraverso un approccio HACCP, i potenziali pericoli legati alla produzione specifica devono essere identificati e vanno intraprese misure di controllo nelle fasi dove si presume ci possa essere un'alta probabilità di contaminazione. I produttori, pertanto, a limite del possibile devono porre rimedio alle contaminazioni provenienti dall'aria, dal suolo, dall'acqua, dai mangimi, dai fertilizzanti, dai pesticidi, dai farmaci veterinari o da qualsiasi altro agente impiegato, ponendo particolare attenzione alla contaminazione fecale e allo smaltimento dei rifiuti. Le sostanze pericolose o di competenza veterinaria devono essere conservate confinate in luoghi dedicati non accessibili a chiunque. È importante tenere aggiornato un registro aziendale in cui riportare lo stato di salute di piante e animali, annotando gli eventuali stati patologici che potrebbero avere effetti negativi sulla salute umana ed animale, riportando anche eventuali trattamenti farmacologici effettuati. In questa ottica gli alimenti e gli ingredienti devono essere protetti con particolare attenzione dalle contaminazioni derivanti da animali infestanti e agenti chimici, fisici e microbiologici. Allo stesso tempo è necessario prevenire il deterioramento attraverso mezzi idonei che agiscano controllando la temperatura, l'umidità o altri parametri chimico-fisici. Le contaminazioni sono evitate anche attraverso lo smaltimento di materiali di scarto in modo igienico, segregando in locali

idonei i prodotti non adatti al consumo umano. Notevole importanza rivestono la pulizia e la manutenzione delle strutture e dei locali, che devono essere eseguite efficacemente, e il grado di igiene personale.

Proseguendo lungo la catena di produzione degli alimenti durante le fasi successive di trasformazione e vendita, sono richiesti ulteriori requisiti igienici generali. Questi elementi devono essere attuati prima dell'implementazione delle procedure HACCP, in modo da fornire le migliori condizioni igieniche in cui poter svolgere le attività di lavorazione.

I requisiti dei locali di lavorazione o di conservazione delle sostanze alimentari sono fissati in relazione a diversi fattori. Innanzitutto la contaminazione deve essere sempre minimizzata e il layout delle strutture deve consentire un sufficiente grado di manutenzione, pulizia e disinfezione, ostacolando allo stesso tempo la contaminazione aerea e l'accesso/persistenza di animali infestanti. La disposizione dei locali deve facilitare il mantenimento delle migliori condizioni igieniche, con riguardo verso la protezione dalle cross-contaminazioni durante e tra le attività. Le superfici e i materiali, soprattutto quelli a contatto con gli alimenti, non devono essere tossici, ma durevoli, facili da pulire e disinfettare. Le superfici dei muri, delle divisorie e dei pavimenti dovrebbero essere di materiale impermeabile, che non rilasci sostanze tossiche, e liscio fino ad un'altezza adeguata. I pavimenti inoltre devono essere costruiti con una pendenza tale che possa favorire il drenaggio e la pulizia. I soffitti e le

strutture fisse dovrebbero essere concepite per minimizzare l'accumulo di sporcizia e condensa, oltre che il mascheramento di particelle. Le finestre devono essere facilmente lavabili e costruite in modo tale da minimizzare l'accumulo di sporcizia, dotate se necessario di schermi lavabili per impedire l'accesso di insetti; se necessario, le finestre devono essere mantenute chiuse. Le porte devono avere superfici lisce, non assorbenti e facili da pulire o disinfettare. Le superfici di lavoro destinate a venire in contatto con gli alimenti, oltre ai requisiti finora elencati, è necessario che siano inerti verso le sostanze alimentari, i detergenti e i disinfettanti normalmente utilizzati. Laddove necessario sono da predisporre controlli ambientali per il monitoraggio della temperatura e dell'umidità.

Particolare importanza riveste la localizzazione degli stabilimenti per evitare possibili fonti di contaminazione, soprattutto quando è chiaro che queste rimarrebbero una minaccia anche dopo la predisposizione di misure di controllo. In linea di massima sono da evitare aree che: presentano inquinamento ambientale particolarmente rilevante, legato eventualmente a attività industriali; sono soggette ad esondazione; sono particolarmente predisposte alle infestazioni di animali indesiderati; mostrano impedimenti geografici per lo smaltimento dei rifiuti, sia solidi che liquidi.

Le attrezzature devono essere mantenute in uno stato di manutenzione e pulizia adeguato e devono essere utilizzate esclusivamente per il loro specifico scopo. D'altra parte devono consentire l'espletamento

delle buone pratiche igieniche, incluse le attività di monitoraggio. Per questo motivo oltre ad essere durevoli e costituite da materiali atossici, devono essere removibili e disassemblabili per consentire le ispezioni per il controllo dello stato di manutenzione, pulizia, disinfezione e di localizzazione di animali infestanti.

Le attrezzature impiegate per cuocere, raffreddare o congelare gli alimenti dovrebbero raggiungere la temperatura target nel minor tempo possibile e mantenerla costante. Le attività di controllo e di monitoraggio della funzionalità reale di queste apparecchiature devono riguardare il parametro fisico in esame e altri elementi, come l'umidità e la velocità del flusso d'aria, che potrebbero esercitare influenze negative sugli alimenti. Attraverso queste attività di monitoraggio è possibile pertanto dimostrare che le temperature o le altre condizioni necessarie per garantire la sicurezza alimentare sono ottenute rapidamente e mantenute efficacemente. Di conseguenza i microrganismi dannosi o indesiderabili, comprese eventualmente le tossine prodotte, sono eliminati o ridotti entro livelli di sicurezza: in pratica, secondo un'ottica HACCP, viene dimostrata la conformità a limiti critici fissati per specifiche fasi produttive, studiate per la gestione di determinati rischi.

I contenitori di rifiuti, sottoprodotti di lavorazione e sostanze non edibili o pericolose devono essere chiaramente identificabili e costituiti da materiali

impermeabili. In aggiunta, potrebbero essere anche tenuti sotto chiave per prevenire la contaminazione accidentale o dolosa degli alimenti.

Gli stabilimenti devono disporre almeno di: un adeguato rifornimento idrico, un sistema di scarico e di smaltimento di rifiuti, locali atti alle operazioni di pulizia, bagni e strutture per l'igiene del personale, un sistema di controllo della temperatura, una ventilazione e una qualità dell'aria ottimale, un sistema di illuminazione consono e stanze di deposito di vari materiali (soprattutto sostanze pericolose). L'apparato idrico deve essere compatibile per la distribuzione, lo stoccaggio eventuale e il controllo della temperatura di acqua potabile, che deve essere sempre a disposizione. La qualità dell'acqua deve essere conforme a standard elevati ed idonea al consumo umano, come indicato dal Decreto Legislativo numero 31 del 2 Febbraio 2001 (attuazione della Direttiva CE numero 83 del 3 Novembre 1998) "sulla qualità delle acque destinate al consumo umano". È tuttavia ammessa la presenza di acqua non potabile, ad esempio per dispositivi anti-incendio, per la produzione di vapore, la refrigerazione o altri fini purché non contaminino gli alimenti e abbia condutture separate. Per questo i sistemi di trasporto di acqua non potabile devono essere chiaramente identificati e non devono avere vie di collegamento o consentire il reflusso in quelli dell'acqua potabile.

Le infrastrutture che sono destinate allo smaltimento dei rifiuti o allo svolgimento delle operazioni di pulizia di utensili ed apparecchiature,

devono essere separate fisicamente dagli altri locali di lavorazione degli alimenti dello stabilimento, per minimizzare il rischio di contaminazione dei prodotti o dell'acqua potabile. Inoltre, i locali impiegati per la pulizia dovrebbero avere a disposizione acqua calda e fredda.

Una delle fonti di contaminazione delle sostanze alimentari è sicuramente rappresentata dall'operatore, e pertanto sono molto importanti le strutture che consentano la cura dell'igiene personale. I bagni dovrebbero essere muniti di apparecchi igienici per la pulizia e l'asciugatura delle mani, oltre che di acqua calda e fredda. I gabinetti generalmente sono appropriati per agevolare comportamenti igienici con un layout idoneo. Infine sono previsti idonei spogliatoi per consentire il cambio degli abiti del personale.

Le strutture devono essere dotate di un sistema di ventilazione che assicuri una buona qualità dell'aria per ridurre il rischio di contaminazione derivante da essa; pertanto tale sistema deve essere adeguatamente pulito e in buono stato di manutenzione. I sistemi di ventilazione hanno lo scopo di prevenire il flusso di aria dalle aree contaminate a quelle più "pulite". In particolare sono da intraprendere misure per eliminare la formazione di aerosol, gocce di condensa, odori che possono influenzare negativamente la qualità dell'alimento. Il controllo della temperatura ambientale e dell'umidità sono due strumenti basilari e molto efficaci per la sicurezza e l'idoneità degli alimenti.

Il sistema di illuminazione, sia esso naturale o artificiale, deve mettere gli operatori nella condizione di poter espletare i propri compiti correttamente e in modo igienico, oltre che poter svolgere le operazioni di controllo e monitoraggio. È importante garantire anche che non venga alterato il colore dei prodotti in lavorazione, affinché non sia ingannevole. Inoltre, le lampade utilizzate devono essere fissate in modo da proteggere gli alimenti da pericoli fisici dovuti a rotture di materiale.

Per favorire il controllo continuo ed efficace dei pericoli che possono eventualmente essere presenti negli alimenti, bisogna stabilire sistemi di pulizia e manutenzione, di controllo degli animali infestanti, di gestione dei rifiuti e di monitoraggio delle procedure di sanificazione.

La manutenzione e le operazioni di pulizia servono a conservare in uno stato di servibilità idoneo le strutture e i macchinari. Questa condizione ideale facilita le procedure di sanificazione, assicura un funzionamento corretto soprattutto nelle fasi critiche e serve a prevenire la contaminazione dei prodotti con pericoli fisici di natura metallica, plastica, chimica o semplicemente detriti, che sarebbero alquanto difficili da eliminare successivamente. In linea generale le procedure di pulizia hanno la funzione di rimuovere i residui alimentari e lo sporco, che potrebbero essere fonte di contaminazione. È importante adeguare i metodi di pulizia e i materiali impiegati in relazione alla natura dell'industria alimentare e ai rischi verso i quali è più facilmente esposta. Successivamente alle

operazioni di pulizia, è spesso molto utile e necessaria la disinfezione. I presidi chimici devono essere manipolati con cautela e utilizzati in accordo con le specifiche tecniche del prodotto fornite dal produttore. Pertanto è opportuno che le istruzioni d'uso, comprensive delle dosi necessarie e dei tempi di azione, vengano esplicitate in specifiche procedure operative all'interno dei manuali di autocontrollo. Infine, i prodotti disinfettanti devono essere conservati in luoghi separati dagli alimenti, in contenitori chiaramente identificati per evitare qualsiasi rischio di contaminazione accidentale. Le procedure di pulizia in base alle necessità devono essere basate sull'azione combinata di metodi fisici, quali il calore, lo spazzolamento, il flusso turbolento, l'utilizzo del vuoto o anche altri metodi che non prevedano l'uso di acqua, e di metodi chimici, impiegando detergenti acidi o alcalini. In ordine di esecuzione le procedure di pulizia generalmente avvengono con la seguente progressione:

1. Rimozione dei detriti più grossolani dalle superfici;
2. Applicazione della soluzione detergente per ammorbidire film batterici o di sudiciume e mantenerli in soluzione o in sospensione;
3. Risciacquo con acqua potabile per la rimozione dei film prima menzionati e dei residui di detergente;
4. Pulizia senza l'utilizzo di acqua per asportare i residui e i detriti;

5. Se necessario, procedere con le operazioni di disinfezione con susseguente risciacquo, a meno che sulle istruzioni del produttore non sia specificato che questo non sia necessario.

Le procedure di pulizia e disinfezione dovrebbero garantire che tutte le parti dello stabilimento siano pulite adeguatamente, incluse le attrezzature.

In particolare le procedure scritte devono per lo meno precisare: le aree, gli oggetti e gli utensili soggetti a pulizia; le responsabilità per ciascun compito; i metodi e le frequenze di pulizia; le disposizioni di monitoraggio.

Per dimostrare la loro efficacia è necessario che siano continuamente monitorate e documentate.

I sistemi di controllo degli animali infestanti servono a ridurre uno dei rischi più rilevanti per la salubrità degli alimenti. Le infestazioni possono avere luogo qualora ci siano siti di riproduzione o fonti alimentari a disposizione. Pertanto le buone pratiche igieniche devono essere indirizzate ad evitare che si vengano a creare le condizioni favorevoli per la sopravvivenza di animali infestanti. Per minimizzare la possibilità di infestazione rappresentano aiuti validi una buona sanificazione che elimini i detriti alimentari e quindi le fonti di sostentamento, adeguati monitoraggi per rilevare prontamente le anomalie e ispezioni dei materiali in ingresso: l'azione combinata di questi diversi fattori consente anche di limitare la necessità di pesticidi. Il buono stato di manutenzione delle strutture aiuta nell'eliminare potenziali vie di accesso agli animali e siti dove possano

procreare. Per questo motivo sarebbe necessario sigillare buchi e punti di scolo, dotare di grate di metallo le finestre aperte, le porte e i ventilatori. D'altra parte gli animali dovrebbero essere scoraggiati verso la colonizzazione degli spazi adiacenti agli stabilimenti. Dal momento che la disponibilità di cibo e acqua incentiva le infestazioni, le fonti alimentari dovrebbero essere stoccate in contenitori a prova di animali ad una certa altezza dal pavimento e lontano dalle pareti e le aree sia dentro che fuori le strutture dovrebbero essere mantenute pulite. Una volta messi in atto questi accorgimenti, lo stabilimento e le zone adiacenti devono essere monitorate regolarmente per individuare tracce di infestazioni. Qualora dovessero evidenziarsi delle carenze, le infestazioni vanno trattate con la massima premura avendo cura di non interferire negativamente con gli alimenti, soprattutto nell'espletare trattamenti con agenti chimici, fisici e biologici. Grande attenzione deve essere posta per la rimozione e lo stoccaggio dei rifiuti. Questi non si devono assolutamente accumulare nelle aree di manipolazione, di stoccaggio e altre aree di lavorazione degli alimenti e nelle loro vicinanze, compatibilmente con l'adatto funzionamento dei lavori.

Le operazioni di monitoraggio dei sistemi di sanificazione servono a dimostrarne periodicamente l'efficacia attraverso attività di audit, ispezioni prima dell'inizio delle lavorazioni, campionamenti microbiologici dall'ambiente e dalle superfici a contatto con gli alimenti. Attraverso queste

azioni è possibile revisionare periodicamente le procedure operative e adattarle alle circostanze.

Un altro capitolo molto importante è l'igiene del personale, per assicurare che coloro che entrano in contatto diretto o indiretto con gli alimenti non rischino di essere fonte di contaminazione. Infatti le persone che non mantengono un appropriato grado di pulizia personale, che sono affetti da determinate malattie o che intraprendono comportamenti scorretti, possono contaminare i prodotti con agenti biologici nocivi per i consumatori. Una persona riconosciuta o sospetta di soffrire di una malattia o di essere comunque un portatore di una patologia trasmissibile per via alimentare non dovrebbe aver accesso alle aree di lavorazione. Di conseguenza qualsiasi persona è tenuta ad informare immediatamente la direzione di sintomi di malattia. Tra le condizioni che dovrebbero condurre all'inibizione dalla manipolazione dei prodotti si possono citare l'itterizia, la diarrea, il vomito, la febbre, le piaghe, le lesioni cutanee visibilmente infette (come tagli e vesciche), nonché le suppurazioni da orecchie, occhi e naso. Allo stesso tempo chi viene in contatto con i prodotti e chi li manipola è tenuto a mantenere un elevato grado di igiene personale e, laddove necessario, ad indossare un abbigliamento protettivo, copricapo, copriscarpe. I tagli e le ferite devono essere protette con materiali idonei impermeabili, se viene concesso il permesso di continuare a lavorare. Il lavaggio delle mani è consigliabile all'inizio delle attività, immediatamente

dopo l'uso dei bagni o dopo la manipolazione di materiali crudi o probabilmente contaminati. I comportamenti pericolosi, che sono quindi da evitare, sono il fumare, lo sputare, il masticare o il mangiare, il soffiarsi il naso o tossire sopra gli alimenti non protetti. Gli effetti personali come gioielli, orologi, anelli e oggetti affini non possono essere indossati o portati nelle aree di lavorazione. Gli stessi requisiti degli operatori sono applicabili anche ai visitatori.

Il personale coinvolto nella produzione di alimenti che è destinato a venire in contatto direttamente o indirettamente con le sostanze alimentari deve essere formato ed istruito sui principi dell'igiene, ad un livello appropriato alle operazioni che sono tenuti a svolgere. È imprescindibile la consapevolezza del proprio ruolo e delle proprie responsabilità per evitare la contaminazione dei prodotti ed il loro deterioramento. Chi è coinvolto nella preparazione degli alimenti inoltre deve avere la giusta conoscenza sulle tecniche più igieniche e sicure di manipolazione. I programmi di addestramento devono essere studiati in relazione a:

- La natura dell'alimento, in relazione alle caratteristiche intrinseche che possano o meno consentire la crescita di microrganismi patogeni o il deterioramento batterico;
- Il modo in cui il cibo è manipolato e confezionato, che tenga conto delle probabilità di contaminazione;

- L'influsso e la natura della preparazione e di ulteriori processi che deve subire prima del consumo finale;
- Le condizioni di conservazione;
- La durata attesa di conservazione prima del consumo.

Una valutazione periodica dell'efficacia della formazione e dei programmi di istruzione deve essere svolta parimenti alla supervisione di routine per la verifica che le procedure siano svolte correttamente. Sulla base di questi risultati devono i programmi essere implementati ed eventualmente rivisti e aggiornati. Gli sforzi maggiori devono essere tesi al mantenimento da parte degli OSA della consapevolezza che tali procedure sono necessarie per mantenere la sicurezza e l'idoneità degli alimenti.

Per produrre alimenti che siano idonei al consumo umano e che siano sicuri devono essere previsti, messi in atto, monitorati e revisionati periodicamente specifici sistemi, che rappresentino misure preventive per controllare i rischi alimentari nelle fasi più appropriate. L'impostazione da seguire è quella del sistema HACCP, grazie alla quale è possibile identificare per ogni fase le operazioni critiche, implementare misure di controllo efficaci per le fasi che possono aiutare a gestire i rischi, tenere monitorate le procedure di controllo per dimostrare la loro continua applicazione ed efficienza. Le procedure devono essere poi periodicamente revisionate per adattarle ai cambiamenti intercorsi. Anche se spesso

vengono sottovalutate, le registrazioni documentarie dei processi di trasformazione, della produzione e della distribuzione, vanno conservate almeno per tutta la shelf-life del prodotto in questione. La documentazione serve infatti ad incrementare la credibilità e a dimostrare l'efficacia e l'effettiva applicazione dei sistemi di controllo.

Il sistema HACCP ha un approccio scientifico e sistematico, grazie al quale si possono identificare specifici pericoli e le misure atte al loro controllo. È uno strumento per valutare i rischi e stabilire di conseguenza sistemi di controllo indirizzati alla prevenzione piuttosto che ad analisi sul prodotto finito. In aggiunta la sua applicazione facilita i controlli da parte delle autorità competenti e promuove i commerci internazionali, aumentando la fiducia nella sicurezza alimentare. Per il successo della sua applicazione è richiesto un approccio multidisciplinare e un pieno appoggio della direzione e della forza lavoro nel fornire le risorse necessarie.

Il sistema HACCP consiste nei seguenti sette principi:

1. Condurre l'analisi del rischio.
2. Determinare i Punti Critici di Controllo (CCP): fase nella quale il controllo può essere applicato ed è essenziale per prevenire o eliminare un pericolo per la salute o ridurlo a livelli accettabili.
3. Stabilire i Limiti Critici: criterio per poter discriminare l'accettabilità dall'inaccettabilità.

4. Stabilire un sistema di Monitoraggio per il controllo dei CCP: sequenza programmata di osservazioni o di misurazioni su parametri di controllo per valutare se un CCP è sotto controllo.
5. Stabilire Azioni Correttive da intraprendere qualora i risultati del monitoraggio indicano che un CCP non è più sotto controllo: qualsiasi azione che deve essere intrapresa quando i risultati del monitoraggio di un CCP indicano una perdita di controllo.
6. Stabilire una procedura di Verifica per confermare che il sistema HACCP funziona efficacemente: applicazione di metodi, procedure, test e altre valutazioni, in aggiunta al monitoraggio, per sancire la conformità al piano HACCP.
7. Stabilire la Documentazione che riguarda tutte le procedure e le registrazioni appropriate ai principi e alla loro applicazione.

Prima dell'applicazione dei principi HACCP in ogni settore della catena alimentare, è importante ricordare che devono essere implementati i programmi pre-requisito (PRPs), come le buone pratiche igieniche e gli idonei requisiti di sicurezza alimentare espressi precedentemente. I PRPs relativi all'HACCP devono essere pertanto fissati e pienamente operativi, oltre che periodicamente verificati per facilitarne l'applicazione corretta e l'implementazione del sistema HACCP con successo. All'attuazione dei suddetti principi è da anteporre la consapevolezza e l'impegno della Direzione. Appunto la buona riuscita dell'HACCP si fonda sia sulla

Direzione che sul personale, che devono necessariamente disporre di un'adeguata conoscenza e pratica nel sistema.

L'applicazione dei sette principi HACCP consiste in compiti specifici che seguono una precisa sequenza logica, che può essere riassunta dalla Figura 1.

È necessaria una fase preliminare di pianificazione che comincia con il mandato della Direzione, che assicura di mettere a disposizione tutte le risorse necessarie alla buona riuscita del programma. Successivamente si passa alla costituzione del gruppo di lavoro HACCP (il team). Infatti deve essere disponibile una adeguata conoscenza e pratica del prodotto, dei processi tecnologici e dei rischi per la salute pubblica. Pertanto è fortemente consigliato un assortimento multidisciplinare. Qualora questa conoscenza non fosse disponibile è opportuno ricorrere ad altre fonti come le associazioni commerciali o industriali, esperti autonomi, autorità competenti, la letteratura scientifica o guide all'applicazione del sistema HACCP. In questa fase viene fissato lo scopo, che generalmente mira alla tutela massima della salute del consumatore. Nello specifico lo scopo deve descrivere la parte nella catena alimentare coinvolta e le classi generali di pericoli implicate. Successivamente si passa alla descrizione accurata del prodotto, soprattutto dei suoi tratti salienti quali: la composizione, la struttura chimico/fisica (pH, A_w), i trattamenti battericidi/batteriostatici applicati, le modalità di confezionamento, la shelf-life e le condizioni di

conservazione, oltre che le modalità di vendita. Qualora l'impresa alimentare dovesse trattare più prodotti è utile raggrupparli in classi sulla base di caratteristiche simili. Il terzo punto riguarda l'identificazione d'uso prevista, sulla previsione dell'utilizzo da parte del consumatore finale. In casi particolari è necessario indicare specifiche classi di consumatori maggiormente vulnerabili, perché più esposti ad un determinato rischio. Conclusa questa parte si passa alla costruzione del diagramma di flusso, che deve coprire tutte le fasi di preparazione di ciascun prodotto. Questo punto è molto importante che venga eseguito accuratamente perché sarà poi lo strumento fondamentale sul quale determinare i CCPs. Per questa sua importanza strategica deve essere confermato sul campo durante tutte le fasi e gli orari di lavorazione e modificato dove necessario. Questa operazione dovrebbe essere svolta da una persona con una sufficiente conoscenza del processo produttivo, per dichiarare senza ombra di dubbio la sua reale corrispondenza e veridicità.



Figura 1: sequenza logica per l'applicazione dell'HACCP (CAC/RPC 1-1969, modificato).

Terminata la fase preliminare di pianificazione inizia la fase “operativa” del sistema HACCP e ci si addentra nei 7 principi.

Il primo (condurre un'analisi del rischio e individuare le misure di controllo) prevede che il team stili una lista di tutti i potenziali pericoli che ragionevolmente si potrebbero presentare in ciascuna fase a partire dalla produzione primaria fino al consumatore finale, in accordo con quanto indicato nello scopo. Successivamente deve essere condotta un'analisi del rischio per identificare quali pericoli, per loro natura, è essenziale che vengano eliminati o ridotti entro limiti accettabili per poter assicurare un alimento esente da rischi. Come parametri di giudizio sono da prendere in esame: la probabilità che questi pericoli si verifichino (rischio) e la severità degli effetti negativi nei confronti della salute pubblica; la valutazione qualitativa o quantitativa della presenza dei pericoli; la probabilità di sopravvivenza o crescita dei microrganismi; la possibile produzione o persistenza di tossine o agenti fisici e chimici; condizioni che possono portare alle situazioni sopra elencate. Sempre in questa fase vengono individuate le misure di controllo richieste per gestire un pericolo specifico. Bisogna considerare che potrebbero essere necessari più mezzi di controllo per ciascun pericolo o che più di un pericolo può essere controllato da una medesima misura di controllo. In fase di analisi del rischio, la valutazione deve tenere presente l'impatto che determinano la materie prime, gli ingredienti, i metodi di produzione (soprattutto del ruolo che svolgono nel controllare i pericoli), l'uso inteso del prodotto finale, le categorie di persone a cui è indirizzato, nonché le evidenze epidemiologiche relative

alla sicurezza alimentare. Sebbene lo scopo del piano HACCP sia quello di individuare CCPs per gestire i rischi connessi, qualora un pericolo non possa essere individuato e ridotto entro limiti accettabili o non possa essere identificato nessun CCP, bisogna considerare di disegnare nuovamente il processo produttivo. Allo stesso modo il piano dovrebbe essere rivisto e dovrebbero essere apportate le necessarie modifiche qualora ci fossero dei cambiamenti nel prodotto, nel processo o a qualsiasi fase.

Tra gli aspetti chiave su cui basare i sistemi di controllo c'è sicuramente in primo piano il monitoraggio del tempo e della temperatura. Infatti la condizione di abuso termico è una delle cause primarie di malattie ad origine alimentare o di deterioramento dei cibi. Detti metodi di controllo possono riguardare l'azione sul tempo e sulla temperatura durante la cottura, il raffreddamento, il processamento e il deposito. Naturalmente laddove venga valutato che il rispetto della temperatura è critico per la salubrità, devono essere predisposti sistemi per il suo controllo. D'altra parte bisogna tenere presente anche la natura della matrice alimentare, come le sue caratteristiche fisiche di attività dell'acqua, pH o del livello di contaminazione microbica iniziale. Altri fattori rilevanti sono la shelf-life prevista per lo specifico prodotto, i metodi di processazione e di confezionamento ed infine il modo di utilizzo (se soggetto a cottura prima del consumo o "ready-to-eat"). Una volta effettuate queste valutazioni è possibile stabilire specifici limiti e tolleranze per le deviazioni dai

parametri di tempo/temperatura impostati. Vista la criticità nel controllo delle temperature, gli apparecchi di rilevazione dovrebbero essere controllati regolarmente e verificati nella loro accuratezza, specificando se necessario l'incertezza di misura connessa. L'importanza della temperatura come mezzo per garantire alimenti sicuri è ulteriormente ribadito dal fatto che tra le fasi, durante il processo produttivo, che sono più frequentemente designate a ridurre i rischi alimentari, vi è il raffreddamento oltre che il trattamento termico.

Un altro elemento di controllo strategico per la sicurezza alimentare è la prevenzione della cross-contaminazione microbica. I batteri patogeni possono essere trasferiti da un prodotto all'altro per contatto diretto o più frequentemente attraverso gli operatori (a seguito di manipolazioni e scorretti accorgimenti igienici), da superfici a contatto o dall'aria. Per questo i prodotti crudi o non lavorati devono essere separati fisicamente dai prodotti finiti o già processati, oppure la loro preparazione deve essere distinta nel tempo attraverso operazioni di pulizia e disinfezione intermedie. L'accesso alle aree di produzione deve essere inibito alle persone non autorizzate. Dove ci possono essere rischi particolarmente elevati, si devono prevedere locali per la sostituzione del vestiario. Il personale addetto dovrebbe essere tenuto ad indossare un abbigliamento protettivo, che includa anche i calzari, e a lavarsi le mani prima dell'ingresso nella catena produttiva. Per minimizzare la persistenza di

microbi al termine o durante le operazioni, dovrebbe essere necessario lavare ed eventualmente disinfettare le superfici a contatto, gli utensili, le attrezzature, gli impianti e gli equipaggiamenti dopo che sono venuti in contatto con materie prime crude, soprattutto se si tratta di carne o di pollame.

Il principio 2 (determinazione dei CCPs) serve a fissare i punti critici di controllo in quelle fasi del processo produttivo strategiche per eliminare un rischio o a ridurlo entro limiti accettabili. Tuttavia potrebbe essere che più di un CCP serva per gestire lo stesso pericolo o che con lo stesso CCP si controllino più rischi. Per la determinazione dei CCPs è possibile avvalersi di diversi mezzi come l'albero delle decisioni (Figura 2), che costituisce un approccio di ragionamento logico. È necessario che, per essere applicabile a tutte le possibili situazioni, sia flessibile. In base a questo strumento è possibile capire se per il controllo di un pericolo una fase è essenziale per garantirne la sicurezza. Ci si potrebbe anche accorgere che, tuttavia, nessun mezzo di controllo esista in quella fase specifica, o in fasi successive, e pertanto potrebbe essere necessario modificare il processo oppure il prodotto in quella fase oppure in quelle precedenti o susseguenti, per inserire un sistema di controllo necessario.

Il principio 3 (fissare i limiti critici) precisa di identificare per ciascun CCP i limiti critici, cioè i criteri per distinguere l'accettabilità dall'inaccettabilità. Detti limiti devono essere validati e, in casi particolari,

più di un limite critico deve essere determinato per ciascun CCP. I criteri devono essere oggettivi e misurabili, pertanto molto spesso si basano su monitoraggi di temperatura, tempo, umidità, pH, A_w , concentrazione di cloruro di sodio, piuttosto che sull'aspetto visivo e sulla struttura.

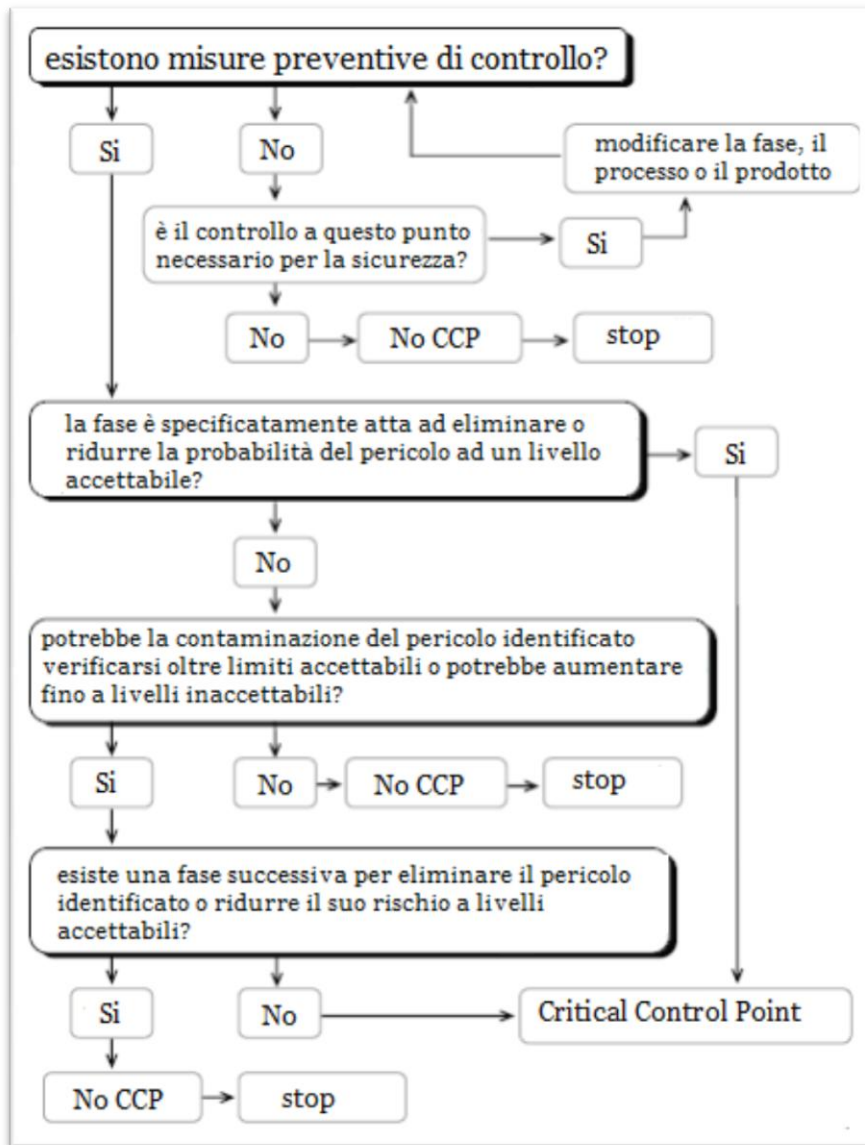


Figura 2: esempio di albero delle decisioni per l'identificazione dei CCPs (CAC/RPC 1-1969, modificato).

Il principio 4 (stabilire un sistema di monitoraggio per ciascun CCP) prevede di mettere in atto una sequenza programmata di osservazioni o di

misurazioni relativamente a parametri di controllo (limiti critici) per dimostrare che un CCP è sotto controllo. La funzione principale è quindi quella di individuare prontamente quando una fase non è più sotto controllo e quindi c'è un'inaccettabile esposizione al rischio. Il monitoraggio si deve pertanto basare su misure effettuate in continuo per fornire informazioni in tempo reale e per consentire prontamente le correzioni adeguate. Possibilmente, quindi, le modifiche al processo dovrebbero essere intraprese quando l'attività di monitoraggio indica una tendenza verso la perdita di controllo (deviazione), e pertanto prima che vengano superati i limiti critici. I dati relativi al monitoraggio devono essere valutati da una persona incaricata, che disponga delle conoscenze e dell'autorità necessaria per poter intraprendere azioni correttive dove necessario. Inoltre, tutte le registrazioni e i documenti associati alle attività di monitoraggio dei CCP devono essere firmate dalla persona che le esegue e dal responsabile del loro controllo incaricato dall'azienda. Qualora il monitoraggio non fosse continuo, la sua frequenza dovrà garantire comunque un sufficiente controllo del CCP. I metodi di monitoraggio devono essere dotati di rapidità di esecuzione, perché misurano l'attività in tempo reale del processo produttivo. Pertanto non sono adatte metodiche analitiche che richiedano indagini lunghe e laboriose. In questo senso misurazioni basate su parametri chimici e fisici sono da preferire ad analisi microbiologiche,

perché possono essere effettuate in tempo reale e sono un indice del controllo microbiologico del prodotto.

Il principio 5 (stabilire le azioni correttive) prevede che siano sviluppate specifiche azioni correttive in modo da affrontare le deviazioni, quando queste avvengono. Le azioni devono garantire che il CCP è stato riportato sotto controllo. Le decisioni devono prevedere inoltre adeguate disposizioni relative al prodotto coinvolto. Anche in questo caso sia le deviazioni che si verificano che le azioni intraprese devono essere registrate e la documentazione deve essere conservata.

Il principio 6 (stabilire procedure di verifica) sancisce di applicare metodi, procedure, test e altri tipi di valutazione, in aggiunta all'attività di monitoraggio, per dimostrare l'efficacia continua del piano HACCP. In questo senso bisogna prevedere attività di audit e campionamenti casuali, per effettuare analisi e per controllare che il piano HACCP funzioni correttamente. Esempi di attività di verifica comprendono la revisione periodica del sistema HACCP e delle registrazioni, la revisione delle deviazioni e delle decisioni relative ai prodotti e la conferma che i CCPs sono sotto controllo. La frequenza deve essere adeguata e le attività devono essere svolte da un'altra persona rispetto al responsabile del monitoraggio e delle azioni correttive, in modo da garantire imparzialità di giudizio. Qualora la verifica non potesse essere attuata da persone interne all'azienda, devono essere incaricate delle persone qualificate esterne o

parti terze. È importante ricordare che prima dell'implementazione del piano HACCP è opportuno svolgere la sua validazione, ottenendo delle prove che tutti gli elementi sono efficaci nel controllo dei pericoli.

Il principio 7 (tenuta della documentazione e delle registrazioni) è un punto che molto spesso viene sottovalutato, ma che riveste una notevole importanza per il corretto funzionamento del piano. È importante che tutte le procedure siano documentate e aggiornate, mentre le registrazioni devono essere accurate ed efficienti. Esempi di documentazione riguardano l'analisi del rischio, la fissazione dei CCPs e la determinazione dei limiti critici, mentre le registrazioni sono relative alle attività di monitoraggio dei CCPs, alle deviazioni e alle azioni correttive associate, alle azioni di verifica eseguite e alle modifiche al piano HACCP. Il sistema di registrazione deve essere il più semplice possibile per essere comunicato facilmente agli operatori. È necessario predisporre dei moduli standard e delle check-list per rendere più efficienti le operazioni. Tuttavia è ammessa una certa flessibilità in relazione alla natura e alle dimensioni dell'azienda.

Infine, è necessario fornire adeguate informazioni sui prodotti per aumentare il flusso di informazioni lungo la catena alimentare. In primo luogo bisogna garantire informazioni disponibili alla figura che è coinvolta nella fase successiva lungo la catena alimentare perché possa manipolarlo, immagazzinarlo e prepararlo nel modo opportuno. Inoltre deve essere attribuito a ciascun prodotto un numero di lotto perché sia facilmente

identificabile e, se necessario, richiamato. I consumatori finali devono disporre delle informazioni minime per poter affrontare scelte consapevoli e per evitare comportamenti sbagliati che potrebbero condurre a contaminazione, crescita o sopravvivenza di microrganismi patogeni. Un giusto spazio meriterebbero i programmi di sensibilizzazione per la salute nei consumatori riguardo i principi generali di igiene alimentare. Lo scopo è far comprendere l'importanza di ogni informazione riguardante il prodotto e di seguire le istruzioni correttamente per fare scelte coerenti.

I requisiti igienici specifici e il sistema HACCP nell'industria delle carni

Addentrandosi maggiormente nella catena di produzione delle carni verso l'ambito di competenza di questo lavoro di tesi, i requisiti di igiene specifici per questo settore, oltre che le linee guida particolari per l'applicazione del sistema HACCP, sono espressi nel codice sulle pratiche igieniche per la carne ("Code of Hygienic Practice for Meat") del Codex Alimentarius (CAC/RPC 58-2005). I concetti sono ripresi anche dal Regolamento CE 853 del 2004 "che stabilisce norme specifiche in materia di igiene dei prodotti di origine animale", anche se non tratta nello specifico dell'allestimento del piano HACCP. In entrambi i casi lo scopo è quello di fornire indicazioni per l'igiene delle carni fresche, delle preparazioni di carne e dei prodotti a base di carne dal momento della produzione primaria (allevamento) fino al punto terminale di vendita al dettaglio. Nello specifico il "Code of Hygienic Practice for Meat" sviluppa i principi generali di igiene alimentare, nell'ambito dei prodotti carnei.

La Produzione Primaria

La produzione primaria è importante che metta a disposizione informazioni relative ai pericoli e alle condizioni che potrebbero essere presenti nella popolazione animale, che potrebbero influenzare

negativamente la sicurezza e l' idoneità delle carni. Questa è una premessa imprescindibile per mettere in atto programmi di igiene basati sulla valutazione del rischio e consente di poter improntare procedure ispettive "tailor-made" sullo spettro e sulla prevalenza delle patologie e dei difetti presenti in una particolare popolazione animale. I produttori primari sono tenuti a registrare tutte le informazioni rilevanti sullo stato di salute degli animali, per rendere questi dati disponibili al macello. Allo stesso modo andrebbero previsti dei sistemi per far ritornare dal macello al produttore primario le informazioni che riguardano lo stato di salute degli animali macellati, per migliorare l'igiene in allevamento, soprattutto quando sono in atto sistemi volontari di gestione della qualità per il loro aumento di efficacia. Le procedure sono da integrare ad eventuali programmi per particolari agenti zoonotici in concerto con l' autorità competente. I programmi possono mirare al controllo o all' eradicazione della presenza degli agenti nella popolazione animale o in gruppi specifici, alla prevenzione dell' introduzione di nuove zoonosi o infine ad attività di monitoraggio o sorveglianza, che forniscano dati di prevalenza dei pericoli nella carne per un approccio basato sulla valutazione del rischio. Per la messa in atto di tutto questo sistema è basilare un efficiente sistema di identificazione degli animali a livello di produzione primaria per poter risalire all' origine delle carni a partire dal macello o dallo stabilimento di lavorazione. Gli animali pertanto dovrebbero essere destinati al trasporto

verso lo stabilimento di macellazione solo se: non presentano un grado di contaminazione esterna che potrebbe influire negativamente sullo svolgimento igienico delle operazioni di macellazione o sezionamento; le informazioni disponibili non possono far presagire che gli animali possano compromettere la sicurezza e l' idoneità delle carni per specifici stati patologici e/o per recenti somministrazioni di farmaci veterinari (in casi particolari si può procedere al trasporto se gli animali sono stati adeguatamente identificati come sospetti e sono destinati ad essere trasportati e macellati separatamente sotto una speciale supervisione); gli animali non sono stati esposti a condizioni stressanti che potrebbero compromettere l' idoneità al consumo umano della loro carne.

Il Trasporto al macello

Il trasporto degli animali verso il macello in linea generale deve avvenire in un modo che non consenta di non influire negativamente sulla sicurezza delle carni. In particolare si deve prestare attenzione a prevenire determinate situazioni che potrebbero verificarsi durante il trasporto. In primo luogo è necessario minimizzare l'imbrattamento e la cross-contaminazione degli animali con materiale fecale. Secondariamente bisogna evitare di introdurre pericoli durante gli spostamenti degli animali e che questi perdano i marchi di identificazione individuale. Infine, particolare rilevanza riveste l'evitare di generare stati di stress non

necessari che potrebbero avere un impatto negativo sull'animale, inducendo ad un aumento dell'escrezione di microrganismi patogeni. Tutti questi punti possono essere ottenuti se i mezzi di trasferimento sono stati progettati per facilitare le operazioni di carico e scarico, con un rischio minimo di provocare lesioni, e per fornire un livello adeguato di ventilazione. Gli animali di specie differenti o della medesima specie, che potrebbero recarsi danno, dovrebbero essere separati fisicamente. La presenza di grate nella pavimentazione e di gabbie è richiesta per limitare l'imbrattamento e la cross-contaminazione, facilitando l'eliminazione del materiale fecale, che deve rimanere il minor tempo possibile a contatto con gli animali. Per minimizzare il rischio di trasmissione di agenti patogeni a causa del viaggio, è fondamentale prestare particolare attenzione che le operazioni di pulizia e disinfezione tra un carico e l'altro siano effettuate efficacemente, per evitare che il mezzo stesso non costituisca la fonte di infezione.

La fase di Macellazione

Gli animali che vengono avviati alla macellazione devono essere pertanto sani, appropriatamente puliti e identificati idoneamente. Tutto il bestiame deve essere ispezionato al momento dell'arrivo, per rilevare anomalie comportamentali o aspetti che possano far intuire la necessità di segregazione di un soggetto o di un gruppo. La visita *ante-mortem* è un atto

fondamentale che precede la macellazione e in questa fase devono essere prese in considerazione tutte le informazioni rilevanti per garantire l'igienicità della carne. La visita *ante-mortem* deve essere eseguita il prima possibile, compatibilmente al fatto che venga offerto agli animali un riposo sufficiente prima di essere avviati alla macellazione. Tuttavia non devono essere tenuti più tempo del dovuto e nel caso in cui passino più di 24 ore tra la visita e l'avvio alla macellazione, questa deve essere ripetuta. L'ispezione deve essere appropriata dal punto di vista scientifico e di analisi del rischio, tenendo in forte considerazione tutte le informazioni rilevanti ottenute dalla produzione primaria. La funzione di questa visita è di supporto all'ispezione *post-mortem*, per individuare qualsiasi alterazione comportamentale, di aspetto o indice di malattia nell'animale ancora in vita. Pertanto i risultati devono essere resi disponibili a chi esegue la visita ispettiva *post-mortem*, prima che si presentino le carcasse degli animali corrispondenti, in particolare per gli animali dichiarati sospetti. Sono applicabili test o procedure sensoriali rilevanti per rivelare rischi associati alle carni, indicati da sintomi clinici di malattia o da anomalie facilmente discriminabili. Attenzione particolare è da porre quando gli animali non appaiono sufficientemente puliti, sono stati alimentati durante il tragitto, hanno una malattia/infezione a carattere zoonosico, ci sono restrizioni quarantenarie, mancano i requisiti di corretta identificazione, le dichiarazioni da parte del produttore sono incomplete od inadeguate

(soprattutto quelle che riguardano i farmaci veterinari). Dove necessario, sono richiesti test di laboratorio per quei pericoli che non possono essere discriminati sulla base di una mera indagine clinica, come nel caso di residui di farmaci e contaminati chimici. A questo proposito le procedure che vengono attuate devono essere mirate alla prevalenza delle malattie ragionevolmente presenti nella popolazione animale, considerando come fattori aggiuntivi la categoria animale, l'area geografica e i sistemi di produzione primaria. Gli animali possono essere giudicati a seguito della visita *ante-mortem* come:

- Idonei per la macellazione
- Idonei per la macellazione con la riserva di una seconda visita *ante-mortem*, quando l'animale non è sufficientemente riposato o è temporaneamente affetto da una condizione fisiologica o metabolica
- Idonei per la macellazione sotto condizioni speciali, che prevedano un differimento della macellazione per i soggetti giudicati sospetti, quando si pensa che a seguito della visita *post-mortem* ci possa essere una parziale o totale esclusione delle carni dal consumo umano
- Non idonei per motivi di sanità pubblica
- Non idonei per ragioni di idoneità delle carni
- Non idonei per cause relative alla salute animale

- Soggetti a macellazione speciale d'urgenza, qualora si presuma che un ritardo nella macellazione potrebbe deteriorare eccessivamente le condizioni dell'animale

Le condizioni di stabulazione degli animali prima della macellazione devono minimizzare il rischio di infezione da microorganismi patogeni tra animali o tra gruppi differenti. La permanenza nelle stalle di sosta ha infatti un'influenza importante su vari aspetti della macellazione e sul sezionamento delle carcasse. Il fattore primario è la pulizia esteriore del mantello dell'animale, soprattutto per quanto concerne le cross-contaminazione batterica tra le carcasse o le altre parti commestibili. Pertanto le stalle di sosta devono essere progettate per contrastare al limite del possibile l'imbrattamento fecale degli animali e le contaminazioni soprattutto tra soggetti appartenenti a gruppi con origine diversa, attraverso la predisposizione di una pavimentazione che consenta un ottimo drenaggio delle deiezioni. La permanenza deve essere adeguata alla condizione fisiologica dei soggetti per non inficiare la visita *ante-mortem* e per facilitare la sua efficace esecuzione: agli animali deve essere pertanto garantito un adeguato riposo, devono essere protetti da condizioni meteorologiche avverse e non ci deve essere eccessivo affollamento. Devono infine essere predisposti dei sistemi per garantire un'adeguata separazione tra animali di specie e classi differenti, soprattutto quelli individuati come sospetti, per impedire che sia fornito cibo prima della

macellazione e per mantenere l'identificazione anche nelle fasi successive. Deve essere presente un sistema di fornitura di acqua pulita sia per l'abbeverata che per la pulizia. A riguardo le aree devono essere progettate per facilitare un'efficace pulizia e disinfezione dei recinti, dei veicoli di trasporto e delle gabbie. Devono infine essere presenti delle strutture per la segregazione di tutte le parti degli animali giudicati non idonei al consumo umano (compreso il contenuto intestinale), possibilmente tenute sotto chiave.

Fermi restando i requisiti per le strutture destinate ad ospitare la lavorazione degli alimenti, espresse nel codice sui principi igienici generali (CAC/RPC 1-1969) e nel Reg. 852/2004, le aree destinate alla macellazione devono garantire una costante marcia in avanti per evitare una contaminazione tra le carcasse e gli animali appena macellati. Per questo motivo devono essere fisicamente separate le aree riservate allo stordimento e alla iugulazione dalle aree che costituiscono la "zona pulita", rappresentata dai locali di eviscerazione e di lavorazione delle carcasse. Parimenti la "zona pulita" deve essere separata dalle restanti aree facenti sempre parte della "zona sporca", cioè quelle destinate alla scottatura, alla rimozione delle setole, alla depilazione finale e alla flambatura delle carcasse. Lo stesso principio di separazione e di marcia in avanti deve essere applicato anche al personale e agli utensili, che non devono assolutamente passare dalla "zona sporca" verso la "zona pulita". Le

persone che si spostano tra le aree devono lavarsi e cambiarsi i vestiti. Devono essere previste, inoltre, stanze separate per lo svuotamento e la pulizia del tratto intestinale, la manipolazione e lo stoccaggio della carne o di parti di animali dichiarati non idonei al consumo umano, il deposito di parti non commestibili (specifiche per le varie specie animali) quali mantelli, corna, zoccoli, piume, nonché i locali per la preparazione e la conservazione di grassi commestibili. Tuttavia anche nelle aree destinate alla lavorazione delle carni, queste non devono venire in contatto con il pavimento, le pareti o con strutture fisse non designate per questo scopo. Anche le carcasse e i relativi organi devono seguire un avanzamento costante per evitare cross-contaminazioni tra elementi presenti sulla stessa linea di macellazione o su linee differenti. Nelle aree destinate alla lavorazione delle carcasse, al disosso o al sezionamento inoltre ci deve essere un adeguato controllo termico attraverso il raffreddamento, la refrigerazione e il congelamento, essendo la temperatura il fattore più importante di controllo dei pericoli per le carni fresche. Infatti, in assenza di una temperatura idonea e di altri controlli ambientali come l'umidità, la carne diventa particolarmente suscettibile alla sopravvivenza e alla crescita di batteri patogeni e di microrganismi alteranti. Pertanto è opportuno implementare sistemi di monitoraggio per la temperatura, l'umidità e il flusso di aria, per assicurare che la situazione sia adeguatamente gestita.

Requisiti aggiuntivi per la Macellazione dei suini

Il codice sull'igiene delle carni (CAC/RPC 58-2005) e il Regolamento CE 853/2004 descrivono anche i requisiti della macellazione e della lavorazione delle carcasse, dell'ispezione *post-mortem* e del sezionamento. Solo i suini destinati ad essere macellati possono essere condotti allo stabilimento e devono subire ciascuno obbligatoriamente l'ispezione *ante- e post-mortem*. La macellazione deve essere effettuata senza indebito ritardo e le operazioni di stordimento, dissanguamento e appesa devono essere proporzionate alla velocità della catena di lavorazione, per evitare accumuli di carcasse. Gli animali che sono scottati o sottoposti a flambatura devono essere raschiati per rimuovere i peli residui, le pellicole, lo sporco e la forfora eventualmente presenti. La trachea e l'esofago devono rimanere intatti durante il dissanguamento, che deve essere il più completo possibile. La lingua va esposta in modo che le tonsille rimangano intatte. Le mammelle di soggetti in lattazione o palesemente patologiche sono da asportare il più rapidamente possibile. Le carcasse dovrebbero essere mantenute separate le une dalle altre per evitare contatti, almeno fino a che non siano state ispezionate. L'acqua nelle vasche di scottatura non deve essere eccessivamente contaminata e bisogna limitare la fuoriuscita o l'accumulo di materiale organico o soprattutto fecale. Si deve fare in modo che siano presentate tutte le parti commestibili dell'animale per la visita ispettiva *post-mortem*. Pertanto tutti gli elementi rimossi devono rimanere

identificabili e attribuibili ad una specifica carcassa. L'ispezione *post-mortem* si basa sull'applicazione di metodi sensoriali e sull'esecuzione di specifici test. Questi comprendono la valutazione visiva della carcassa e dei visceri, la palpazione di aree specifiche e l'incisione, laddove necessaria. Le procedure comunque devono mirare a ridurre al minimo la cross-contaminazione attraverso la manipolazione. Come previsto dal Reg. 854 del 2004, se necessario si possono applicare test addizionali, quando ci siano delle positività a dei test di screening o ci sono pericoli che non sono identificabili dalle procedure sensoriali (microrganismi, parassiti, residui medicinali, contaminanti chimici). Successivamente, nelle fasi seguenti di raffreddamento, disosso, sezionamento, lavorazione, confezionamento e imballaggio particolare attenzione deve essere rivolta al controllo della temperatura, che deve essere ridotta il più velocemente possibile per minimizzare il rischio di crescita di microrganismi e la conseguente formazione di tossine. A riguardo è auspicabile non interrompere mai la catena del freddo, anche durante il trasporto e la manipolazione. Se le carcasse vengono appese in una cella frigorifera, deve essere consentita un'adeguata circolazione di aria tra le fila ed è da prevenire la contaminazione derivante il gocciolamento di fluidi, anche dai soffitti per effetto della condensa. Nelle aree di sezionamento le carni devono essere portate progressivamente in base alla necessità per evitare accumuli. Quando la carne fresca è sezionata prima del *rigor mortis*, deve essere

immediatamente e direttamente trasportata nelle aree di sezionamento, con temperatura controllata.

I Controlli di Processo

La carne è esposta ad una notevole varietà di pericoli, derivati dalla produzione primaria (es. *Salmonella* spp., residui di farmaci veterinari), dall'ambiente di lavorazione (es. *Listeria monocytogenes*) e dagli operatori (es. *Staphylococcus aureus*, virus dell'epatite A). Pertanto sono necessari specifici controlli di processo, che sappiano coniugare i requisiti di igiene (GHP) generali e specifici nell'industria delle carni, finora descritti, e il sistema HACCP. Per “controllo di processo” si intende l'insieme delle condizioni e delle misure che sono applicate durante i processi produttivi, necessarie per ottenere la sicurezza e l'idoneità delle carni. Molte fasi della macellazione e della lavorazione delle carcasse hanno il potenziale di causare una contaminazione significativa della carne, come l'eviscerazione, la raschiatura della carcassa, l'ispezione *post-mortem*, il sezionamento e le ulteriori manipolazioni, oltre che il mancato rispetto della catena del freddo. Pertanto i controlli di processo dovrebbero limitare la contaminazione microbica al limite del possibile, secondo un approccio basato sulla valutazione del rischio. Il sistema HACCP dovrebbe pertanto essere applicato ovunque possibile come mezzo di scelta per il controllo di processo, anche se è necessario ed imprescindibile il supporto dei

prerequisiti (GHP-GMP), che includono anche le procedure standard di sanificazione (SSOPs). Di conseguenza devono essere fissati degli obiettivi di rendimento (definiti come la frequenza o la concentrazione massima di un pericolo nell'alimento in una fase specifica della catena alimentare che contribuisce ad un livello appropriato di protezione (ALOP)) basati su criteri prestazionali per giudicare l'esito del controllo delle operazioni e della visita ispettiva *post-mortem*. Un sistema di controllo di processo documentato dovrebbe descrivere le attività per garantire l'igiene delle carni (includendo anche le procedure di campionamento), gli obiettivi di rendimento, le attività di verifica e le azioni sia correttive che preventive. In assenza di una sufficiente conoscenza dei rischi per la salute umana, i criteri prestazionali possono basarsi inizialmente su studi condotti sulle performance del momento, per poi essere modificati in modo idoneo in relazione agli obiettivi di sanità pubblica. I criteri servono per facilitare la validazione del controllo del processo, per derivare i parametri di processo per ciascuna fase della produzione e per consentire col tempo una certa flessibilità. I parametri microbiologici si adattano sia ai criteri di processo che ai fini della verifica e dovrebbero essere pertanto inclusi nei piani HACCP. È importante che le verifiche siano rilevanti per il tipo di prodotto e per i rischi del consumatore, considerando anche le categorie a rischio.

Tra le attività per garantire l'igiene, le Procedure Operative Standard di Sanificazione (SSOPs) rivestono grande importanza per minimizzare sia

direttamente che indirettamente la contaminazione delle carni. Un sistema adeguato garantisce che le strutture e le attrezzature sono pulite e sanificate prima dell'inizio delle operazioni e la situazione è mantenuta anche durante le stesse. Le SSOPs devono essere sviluppate e descritte in maniera precisa. In particolare sono da specificare le relative frequenze, il personale responsabile della loro esecuzione e del relativo monitoraggio, la documentazione che attesti il monitoraggio e le azioni correttive e preventive intraprese, le eventuali decisioni che riguardano il prodotto e la periodica valutazione dell'efficacia delle SSOP. La verifica può avvalersi di criteri microbiologici, impiegando metodi statistici di valutazione dei trend igienici.

La Verifica dell'efficacia dei controlli di processo

Il Codice sull'igiene delle carni (CAR/RPC 58-2005) indica inoltre la verifica basata su parametri microbiologici come uno strumento adatto per un approccio basato sul rischio lungo la catena alimentare. La fissazione di criteri microbiologici per la sicurezza degli alimenti infatti garantisce un adeguato livello di protezione per il consumatore e allo stesso tempo fornisce la massima flessibilità all'industria delle carni, in termini di sistemi di controllo dei processi. Pertanto, dove necessario, obiettivi prestazionali o criteri di efficacia microbiologici dovrebbero essere fissati e inclusi nelle procedure di verifica dei controlli di processo. Questi non sono

da confondere con i criteri microbiologici, dato che questi ultimi discriminano l'accettabilità dall'inaccettabilità di un prodotto o di un lotto. È importante ricordare, comunque, che ogni specifica microbiologica deve essere fondata su principi scientifici chiari e, dove applicabile, anche le procedure, i metodi analitici e i limiti (CAC/RPC 1-1969). Una volta che il controllo di processo è stato validato all'interno di un sistema HACCP, l'attività di verifica attraverso test microbiologici serve per assicurare che siano rispettati i requisiti di sicurezza alimentare, qualora fossero significativi in termini di protezione del consumatore. In particolare le indicazioni che possono fornire sono relative a:

- Giudicare l'adeguatezza e l'efficacia del controllo di processo di uno stabilimento, in relazione alla contaminazione fecale o proveniente da un'altra fonte;
- Assicurare che il livello di controllo per pericoli specifici è sufficiente a garantire la salute pubblica;
- Facilitare lo sviluppo di criteri di processo in fasi specifiche, che raggiungano gli obiettivi prestazionali microbiologici e garantiscano i criteri di efficienza;
- Identificare il bisogno di revisione e nuova predisposizione del piano HACCP;
- Comparare oggettivamente i risultati di differenti sistemi di controllo di processo in situazioni non sempre perfettamente sovrapponibili;

- Fornire assicurazione idonea alle autorità competenti.

Nella predisposizione di requisiti microbiologici aziendali devono essere considerate tutte le informazioni utili, disponibili lungo la catena alimentare, includendo lo stato di salute degli animali con riferimento alla salute pubblica. Inoltre i test dovrebbero essere specifici per i pericoli presenti, il prodotto in esame e i processi produttivi. Nella fase di fissazione delle metodiche analitiche, bisogna considerare anche la probabilità di una distribuzione non omogenea dei microrganismi nel campione e la variabilità inerente le procedure analitiche. I requisiti devono essere ragionevolmente raggiungibili e applicati solamente ai punti della catena alimentare specificati. La severità dei requisiti microbiologici dovrebbe essere proporzionale al rischio per la salute. In assenza di una conoscenza sufficiente dei rischi, i requisiti dovrebbero inizialmente essere fissati sulla base di studi epidemiologici e successivamente essere modificati in modo appropriato in relazione agli obiettivi di salute pubblica. I piani di campionamento devono essere rappresentativi della popolazione animale e della variabilità biologica dei pericoli nelle materie alimentari, nell'area geografica, nel tipo di allevamento e nella stagionalità. D'altra parte è richiesta una standardizzazione del piano di campionamento, includendo specifiche sulle fasi comprese, sui prodotti, sulla grandezza e sul tipo di campione, il periodo di prelievo, i metodi di reperimento e di trasporto. Il metodo di campionamento può essere distruttivo, attraverso il

prelievo di materiale, o non distruttivo, con l'esecuzione di tamponi e spugne per il campionamento delle superfici. È importante ricordare che nessun metodo può ottenere il prelievo di tutta la flora presente e che il metodo non distruttivo può reperirne solo una parte. Le analisi in fasi multiple lungo la catena alimentare possono fornire maggiori informazioni sul controllo di processo e consentire una risposta più mirata alle non-conformità.

Gli Indicatori Microbiologici

I test microbiologici sono basati su microrganismi che sono indice della presenza di pericoli per la salute umana o sui batteri patogeni stessi. Per ragioni pratiche, i requisiti microbiologici non sono adatti verificare in corso il piano HACCP, anche se i test dovrebbero essere condotti con frequenza sufficiente per assicurare l'efficacia di qualsiasi criterio di processo, che rientra in un piano di autocontrollo. In questo senso i criteri microbiologici servono a dichiarare appropriati i CCP nel controllare i rischi connessi. Nel caso di microrganismi indicatori, come *Escherichia coli*, le Enterobacteriaceae e la conta aerobica totale, la loro enumerazione deve riflettere le condizioni che rivelano un controllo, o meno, del processo. Piani di campionamento a 2 o 3 classi di attributi che specificano i limiti dei microrganismi (m o M) sono necessari. Nel caso di campionamenti a 3 classi di attributi, se i requisiti sono stabiliti sulle

performance attuali dell'industria, il valore dell'ottantesimo percentile può essere impiegato per il valore m e il novantottesimo per M , in associazione con approcci statistici. Nel caso di pericoli specifici (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*), la loro presenza dovrebbe riflettere lo stato di contaminazione prima della macellazione (contaminazione superficiale dell'animale) o in punti specifici durante la processazione delle carcasse. In questo ultimo caso, i piani di campionamento a 2 classi sono più idonei (presenza/assenza). Sebbene non ci siano metodi univoci per determinare la frequenza del campionamento, si può far riferimento ai processi specifici, al numero di animali, alla fonte delle materie prime, al tipo e alla natura dei processi e al volume di produzione. Inoltre la frequenza può essere modificata in relazione ai risultati ottenuti.

I metodi per la ricerca e per la numerazione devono essere naturalmente dotati di praticità, accuratezza, riproducibilità, sensibilità e selettività. Pertanto è opportuno utilizzare solo metodi per i quali sia l'attendibilità che la riproducibilità siano state validate in condizioni sperimentali. Tuttavia, in casi di controversia è opportuno fare ricorso a metodi di riferimento riconosciuti, quali le metodiche ISO. In caso di non conformità con i requisiti microbiologici, devono essere previste le azioni da intraprendere, proporzionali ai risultati dei test e all'impatto sulla salute pubblica di specifici batteri patogeni. Nel caso siano disponibili dati epidemiologici a livello di produzione primaria o siano in atto programmi

nazionali di controllo di agenti zoonotici specifici, come per *Salmonella* spp. (Regolamento (CE) n. 2160 del 2003 “sul controllo della *Salmonella* e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti”; Dec. (CE) n. 668 del 2006; Dec. (CE) n. 55 del 2008), a seguito di programmi di controllo o eradicazione di specifici microrganismi patogeni, le azioni conseguenti ai controlli di processo a livello di industria di macellazione possono includere considerazioni sul livello dei pericoli nelle fasi precedenti la macellazione. Nel caso di non conformità ripetute, l'autorità competente, in aggiunta ad altre azioni, ha la facoltà di richiedere all'operatore dello stabilimento di revisionare e rivedere il piano HACCP e potrebbe ritenere necessaria una frequenza di campionamento maggiore per verificare se il richiesto livello di controllo del processo è stato ripristinato.

I Criteri Microbiologici applicabili all'industria di macellazione suina

Con l'entrata in vigore del Regolamento (CE) n. 2073/2005 “sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari”, e successive modifiche (Reg. n. 1441 del 2007; Reg. n. 365 del 2010), viene fornito un importante strumento operativo per gli operatori del settore alimentare, che devono provvedere e dimostrare la conformità ai criteri di sicurezza alimentare e di igiene del processo, mediante il campionamento e l'analisi dei prodotti alimentari. Si tratta indubbiamente di una norma che introduce elementi importanti di novità nell'ambito del controllo microbiologico degli alimenti in quanto fissa alcuni criteri necessari per la protezione del consumatore basati sulla valutazione del rischio, garantendo allo stesso tempo una più omogenea valutazione dei prodotti nell'ambito del mercato unico.

Il Regolamento 2073/2005 afferma che i criteri microbiologici devono servire per indicare come orientarsi nello stabilire l'accettabilità dall'inaccettabilità di un prodotto alimentare e dei relativi processi di lavorazione, manipolazione e distribuzione. Pertanto l'applicazione dei criteri microbiologici deve costituire parte integrante dell'attuazione delle procedure HACCP e di altre misure di controllo dell'igiene. Infatti viene ribadito che la sicurezza degli alimenti è garantita principalmente da misure

preventive, quali la messa in atto di pratiche corrette in materia di igiene e di procedure basate sui principi dell'analisi dei rischi e dei punti critici di controllo (procedure HACCP). I criteri microbiologici possono essere applicati per la validazione e la verifica di procedura HACCP e di altre misure di controllo dell'igiene. La funzione dei criteri microbiologici è quella di fissare una soglia oltre la quale un alimento sia da considerarsi contaminato in modo inaccettabile da microrganismi cui tali criteri si riferiscono, e che pertanto determinati processi non sono sotto controllo. Il campionamento microbiologico delle carcasse al macello viene inserito dal Reg. 2073/2005 nei "Criteri di igiene del processo", definendoli come indici del funzionamento accettabile di un processo di produzione. Questi criteri tuttavia non si applicano ai prodotti immessi sul mercato e fissano un valore di contaminazione indicativo al di sopra del quale sono necessarie misure correttive volte a mantenere l'igiene del processo di produzione in ottemperanza alla legislazione in materia di prodotti alimentari.

Categoria alimentare	Microorganismi	Piano di campionamento		Limiti		Metodo d'analisi di riferimento	Fase a cui si applica il criterio	Azione in caso di risultati insoddisfacenti
		n	c	m	M			
2.1.2 Carcasse di suini	Conteggio delle colonie aerobiche			4,0 log ufc/cm ² log medio giornaliero	5,0 log ufc/cm ² log medio giornaliero	ISO 4833	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione e revisione dei controlli del processo
	Enterobatteriacee			2,0 log ufc/cm ² log medio giornaliero	3,0 log ufc/cm ² log medio giornaliero	ISO 21528-2	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione e revisione dei controlli del processo
2.1.4 Carcasse di suini	<i>Salmonella</i>	50	5	Assente nell'area esaminata per carcassa		EN/ISO 6579	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione e revisione dei controlli del processo, dell'origine degli animali e delle misure di biosicurezza nelle aziende di origine

Figura 3: criteri microbiologici per le carcasse suine, inseriti nel Capitolo 2 “Criteri di igiene del Processo” dell’Allegato 1 del Regolamento (CE) n. 2073/2005.

Per quanto riguarda l'ambito di questo lavoro di tesi, i criteri microbiologici applicabili alle carcasse suine sono inseriti tra i criteri di igiene del processo del Regolamento 2073/2005, Allegato 1 Capitolo 2 (Figura 3). Questi sono rappresentati dal conteggio delle colonie aerobiche, dalla numerazione delle Enterobacteriaceae e dalla ricerca di *Salmonella* spp. Per tutti e tre, il criterio è applicabile al termine della macellazione, ma prima del raffreddamento delle carcasse. Le azioni susseguenti a risultati insoddisfacenti devono prevedere il miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione, la revisione dei controlli di processo e, per quanto concerne solo *Salmonella* spp., il controllo dell'origine degli animali con particolare attenzione alle norme di bio -sicurezza adottate.

Per il conteggio delle colonie aerobiche il metodo analitico di riferimento è la norma ISO 4833 del 2003 (ISO 4833:2003). I risultati sono da ritenersi soddisfacenti se il logaritmo medio giornaliero (ottenuto dalla media aritmetica dei valori della giornata di campionamento) è inferiore a 4.0 unità logaritmiche di UFC/cm², accettabile se compreso tra 4 e 5 unità logaritmiche di UFC/cm² e insoddisfacente se superiore a 5 unità logaritmiche di UFC/cm².

Per la numerazione delle Enterobacteriaceae il metodo analitico di riferimento è la norma ISO 21528, parte 2, del 2004 (ISO 21528-2:2004). I risultati sono da ritenersi soddisfacenti se il logaritmo medio giornaliero è

inferiore a 2.0 unità logaritmiche di UFC/cm², accettabile se compreso tra 2 e 3 e insoddisfacente se superiore a 3.

Per la ricerca di *Salmonella* spp. il metodo di analisi di riferimento è la norma EN/ISO 6579 del 2002 (EN/ISO 6579:2002/Amd 1:2007). Sono da prelevare 50 campioni aggregati provenienti da altrettante carcasse in 10 sessioni di campionamento successive. Il risultato è soddisfacente se *Salmonella* spp. viene rilevata nell'area sottoposta a campionamento per carcassa per un numero non superiore a 5 campioni, insoddisfacente nel caso contrario. Questo numero massimo si adegua dopo ogni sessione di campionamento, tenendo conto dei risultati delle ultime 10 sessioni. In ogni sessione di campionamento sono prelevate casualmente 5 carcasse.

I siti nei quali sono prelevati i campioni sono scelti tenendo conto della tecnica di macellazione utilizzata in ciascun impianto. Quando si procede al campionamento per il conteggio di Enterobacteriaceae e di colonie aerobiche, i prelievi sono effettuati in 4 siti di ogni carcassa. Qualora a questo scopo sia utilizzato il metodo non distruttivo, l'area campione è di almeno 100 cm² per sito di campionamento. Quando si prelevano campioni per la ricerca di *Salmonella* spp., è utilizzato un metodo di prelievo con spugna abrasiva. L'area campione è di almeno 100 cm² per sito selezionato. Quando i campioni sono prelevati sulle carcasse da diversi siti, prima di essere esaminati sono aggregati.

Gli operatori del settore alimentare dei macelli devono prelevare i campioni per l'analisi microbiologica almeno 1 volta alla settimana. Il giorno di campionamento deve variare da una settimana all'altra, affinché sia coperto ogni giorno lavorativo. Per quanto riguarda il campionamento destinato alla ricerca di Enterobacteriaceae e al conteggio delle colonie aerobiche la frequenza può essere ridotta a 1 volta ogni 2 settimane qualora si ottengano risultati soddisfacenti per 6 settimane consecutive. Per *Salmonella* spp. la frequenza può essere ridotta a 1 volta ogni 2 settimane qualora si ottengano risultati soddisfacenti per 30 settimane consecutive. Ulteriori riduzioni sono previste se è in atto un programma di controllo nazionale o regionale ai sensi del Regolamento (CE) 2160/2003 e se tale programma prevede prove che sostituiscano suddetto campionamento o se viene dimostrato che la prevalenza di *Salmonella* è bassa negli animali acquistati dal macello.

Per quanto riguarda i metodi di campionamento non distruttivo, la scelta dei siti di prelievo dei campioni e le regole per la loro conservazione e il trasporto fa riferimento alla norma ISO 17604 del 2003 (ISO 17604:2003). Detta norma ha lo scopo di specificare i metodi di campionamento per la ricerca e la numerazione di microrganismi sulla superficie delle carcasse di animali appena macellati. Queste attività possono essere intraprese per:

- Il controllo di processo negli stabilimenti di macellazione o per le attività di verifica
- Sistemi di assicurazione basati sulla valutazione del rischio per determinare la sicurezza del prodotto
- Programmi di sorveglianza per la prevalenza di batteri patogeni

I sistemi di campionamento devono garantire che ogni carcassa abbia la stessa probabilità di essere selezionata. Le fasi in cui avvengono le operazioni di campionamento devono essere in relazione alle pratiche di macellazione. Esempi di punti di controllo sono: dopo la raschiatura delle carcasse; dopo la scottatura nelle vasche di acqua calda; dopo l'eviscerazione; nella cella frigorifera minimo 12 ore dopo la macellazione. Tuttavia queste considerazioni sono applicabili solo per il controllo di processo, dato che il Regolamento 2073/2005 sancisce che il campionamento legale sia effettuato solo al termine della macellazione, ma prima del raffreddamento. La scelta dei siti da testare sulla carcassa dipende dalle tecniche di macellazione adottate e non è vincolante. Tuttavia è importante mantenere costante la scelta nel corso del tempo. Lo scopo è quello di selezionare i siti a maggior probabilità di contaminazione. Per il suino la norma indica i seguenti siti riportati nella Figura 4: parte distale degli arti posteriori (punto 1); coscia laterale (punto 2); addome laterale o ventre (punto 3); regione medio - dorsale posteriore o lombi (punto 4); addome mediale (punto 10).

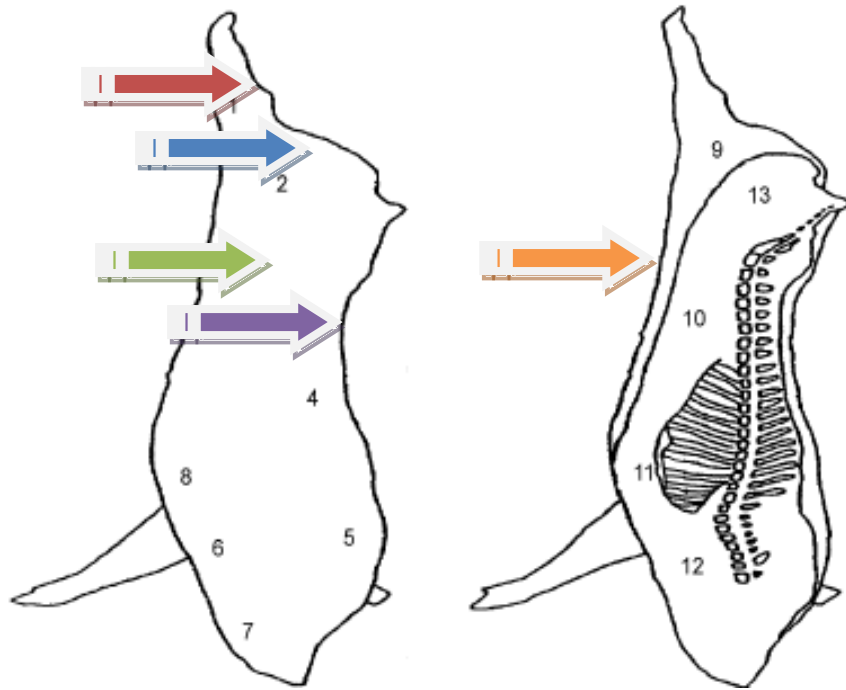


Figura 4: esempio di siti per il campionamento superficiale di carcasse suine (ISO 17604:2003).

Il Regolamento 1441/2007 completa il Regolamento 2073/2005, dato che in quest'ultimo per le carcasse suine sottoposte alla ricerca di *Salmonella* spp. viene determinata l'area campione (che deve essere almeno pari a 100 cm² per sito selezionato), ma non è specificato né il numero di siti di campionamento, né l'area totale del campione. Pertanto il Regolamento 1441/2007 stabilisce che quando si prelevano campioni per la ricerca di *Salmonella*, venga utilizzato un metodo di prelievo con spugna abrasiva. Sono da selezionare le aree a più alta probabilità di contaminazione e l'area totale del campione deve essere di almeno 400 cm². I risultati sono da esprimere in base a quanto indicato nella norma ISO 7218:2007, soprattutto per quanto riguarda l'espressione dell'incertezza di

misura. In base a tale norma, le unità di misura utilizzate possono essere Unità Formanti Colonia (UFC) per grammo o millilitri, ma non cm².

Infine, per concludere l'argomento, è necessario ricordare che l'Intesa Stato-Regioni sulle "Linee guida relative all'applicazione del Regolamento (CE) della Commissione europea n. 2073 del 15 Novembre 2005 che stabilisce i criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari" (Determinazione Nazionale del 10/05/2007) fornisce ulteriori indicazioni a riguardo. Tale provvedimento rileva che in ambito nazionale l'emanazione del Regolamento (CE) 2073/2005 potrebbe creare confusione ed incertezza operativa, dal momento che la Direttiva Comunitaria n. 41 del 2004 (Dir. (CE) 41 del 2004), attuata dal Decreto Legislativo n. 193 del 2007, abroga le direttive verticali sugli alimenti di origine animale, che subordinano la conformità di talune tipologie di alimenti a parametri microbiologici. In particolare le norme nazionali in contrasto con le norme europee sono automaticamente caducate, mentre norme nazionali incompatibili devono essere inapplicate dal giudice nazionale. Pertanto i provvedimenti normativi pre-esistenti sono da ritenersi in vigore per gli aspetti non contrastanti con la nuova normativa, come ad esempio la Legge n. 283 del 1962 e il suo Regolamento di Attuazione (DPR n.327 del 1980).

L'operatore economico del settore alimentare che impiega carni di animali della specie suina deve acquisire dallo stabilimento di macellazione, nell'ambito delle proprie procedure di controllo, le pertinenti

informazioni relative all'effettiva prevalenza di *Salmonella* spp. sulle carcasse. Viene evidenziato come il Regolamento 2073/2005 sia indirizzato ai titolari delle industrie alimentari, che lo devono utilizzare come riferimento per le verifiche e la validazione dei piani di autocontrollo e per verificare il livello di sicurezza delle proprie produzioni, come previsto dalla legislazione comunitaria. Tuttavia i criteri in esso riportati si applicano anche ai campioni effettuati durante i controlli ufficiali, sia nell'ambito del commercio intracomunitario che delle importazioni. In particolare i controlli di processo spettano in via principale alle imprese alimentari e rappresentano uno strumento per la verifica e la validazione delle procedure di autocontrollo rivolte alla certificazione delle garanzie di sicurezza alimentare. Invece i controlli sulla sicurezza degli alimenti, che riguardano gli alimenti già in commercio o pronti per la vendita, competono oltre che al produttore anche agli organi pubblici di controllo e rappresentano uno strumento di monitoraggio sull'efficacia dei sistemi di autocontrollo e di verifica della conformità dei prodotti agli standard di sicurezza stabiliti dai Regolamenti comunitari, in rapporto alle caratteristiche del prodotto, alle indicazioni riportate in etichetta ed all'uso abituale. Per quanto espresso è opportuno che l'attività di controllo ufficiale svolta nel corso del processo produttivo si attenga alla verifica del rispetto dei criteri di igiene del processo e che il controllo svolto alla fine

del processo di produzione o in fase di distribuzione del prodotto contempli il rispetto dei criteri di sicurezza.

Qualora i criteri di igiene del processo vengano verificati dal controllo ufficiale, il superamento dei limiti previsti non determina la ripetizione del parametro difforme, né causa azioni sanzionatorie o penali. Comporta invece una revisione delle procedure di autocontrollo, mentre la ripetizione del parametro non difforme e la revisione di analisi avviene esclusivamente per i criteri di sicurezza. Secondo questa interpretazione quindi i prelievi effettuati presso gli stabilimenti di produzione per la verifica dei criteri di igiene sono eseguiti in aliquota singola, costituita dal numero di unità campionarie previste dai rispettivi criteri di igiene da verificare. Al contrario i campioni destinati a verificare i criteri di sicurezza andranno eseguiti in 4 o 5 aliquote al fine di garantire i diritti della difesa. Quando lo scopo sia quello di verificare in modo specifico l'accettabilità di un lotto o di una partita, ogni aliquota deve contenere il numero di unità campionarie previste dal Regolamento (CE) n. 2073/2005. Ciascuna unità campionaria inoltre deve essere costituita da una quantità ponderale di matrice adeguata per il numero di determinazioni da eseguire. Qualora il materiale disponibile sia insufficiente per allestire tutte le aliquote previste, si deve procedere a prelevare la quantità di materiale necessaria a costituire un'unica aliquota formata dal numero di unità campionarie previste dal

Regolamento, su cui si procede ad eseguire analisi unica irripetibile, garantendo i diritti della difesa del caso.

Per le modalità di campionamento delle carcasse la Determinazione si riferisce alla norma ISO 17604. Per la conta delle colonie aerobiche e delle Enterobacteriaceae i 4 possibili punti di prelievo sono scelti tra quelli previsti da tale norma. Tuttavia, per dare continuità alle interpretazioni dei risultati secondo quanto prescritto nella Decisione n. 471 del 2001 è consigliabile continuare ad effettuare i prelievi negli stessi punti di reperi ivi individuati, con la possibilità che l'operatore economico opti per altri siti tra quelli indicati nella norma ISO 17604, dopo aver effettuato una validazione del sistema proposto. Per i suini questi sono quindi quelli indicati nella Figura 5: lombo, guancia, faccia mediale della coscia e pancetta (ventre). Tali punti sono utilizzabili anche per la ricerca di *Salmonella* spp. sulle carcasse, considerando una superficie pari a 100 cm² per sito campionato. In ogni caso i siti di campionamento devono essere descritti nelle pertinenti procedure elaborate dall'operatore economico (OSA).

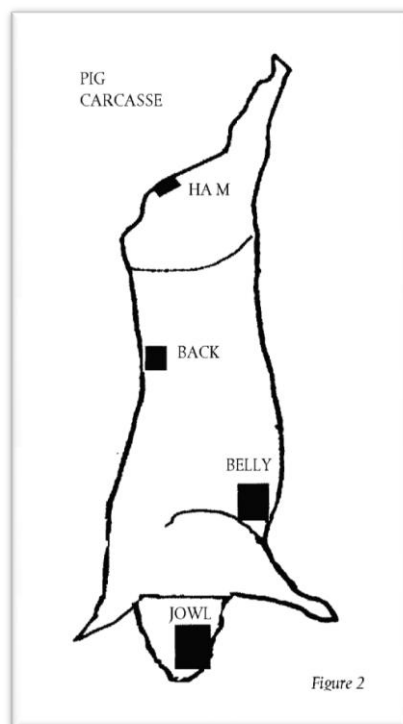


Figura 5: punti di campionamento per l'analisi delle carcasse suine (Decisione (CE) n. 471 del 2001).

In caso di applicazione del metodo di campionamento non distruttivo, il Regolamento (CE) n. 2073/2005 non disciplina adeguatamente le modalità di interpretazione dei risultati per la conta delle colonie aerobiche e delle Enterobacteriaceae. Pertanto l'operatore economico deve adottare e descrivere nell'ambito delle proprie procedure di autocontrollo uno dei seguenti criteri, in accordo con la Determinazione Nazionale del 10/05/2007:

- Il valore "m" è stabilito sulla base della media dei valori ottenuti dallo stabilimento negli ultimi 12 mesi moltiplicata per 1.5. Il valore

“M” invece deriva dalla media del 5% dei risultati peggiori degli ultimi 12 mesi.

- I valori “m” e “M” sono pari a un quinto dei valori “m” e “M” individuati nel capitolo 2 dell’allegato I del Regolamento (CE) n. 2073/2005 per le carcasse suine.

A questo proposito con la dicitura “tendenza ad ottenere risultati insoddisfacenti”, presente nel Regolamento n. 2073/2005, si deve intendere, secondo quanto espresso nella Determinazione Nazionale del 10/05/2007, l’ottenimento di un valore superiore per una sola volta del valore “M” o per 3 volte consecutive compreso tra “M” e “m”. In questa evenienza l’operatore del settore alimentare deve applicare tutte le misure previste in caso di ottenimento di un risultato insoddisfacente e le azioni correttive devono essere documentate. Nel caso in cui una serie di campionamenti per la ricerca di *Salmonella* spp. risulti non favorevole, l’operatore deve intraprendere le azioni successive ad un risultato insoddisfacente, riportante nell’allegato I capitolo 2 nel relativo criterio di igiene del processo (Reg. 2073/2005), includendo se del caso anche campionamenti su superfici a contatto diretto o indiretto con le carcasse. Se anche una seconda serie consecutiva di campionamenti non risulti favorevole, oltre alle misure precedenti, sono da identificare le partite degli animali risultati positivi, è necessario comunicare all’allevatore le positività chiedendogli al contempo l’attuazione delle opportune misure di gestione

dell'infezione in allevamento. Nel caso in cui anche la terza serie consecutiva di campionamenti per *Salmonella* spp. dovesse risultare sfavorevole, oltre a verificare le azioni intraprese dall'operatore del settore alimentare nei punti precedenti, l'autorità competente valuta l'opportunità di adottare una o più misure di cui all'articolo 54 del Regolamento (CE) n. 882/2004. Tuttavia le carcasse i cui risultati analitici hanno dato esito sfavorevole in regime di autocontrollo, non sono oggetto di obbligo di ritiro. Il responsabile dell'industria alimentare deve comunque dimostrare di avere attuato, se del caso, le pertinenti azioni correttive, giudicate idonee dall'Autorità Competente.

Per quanto riguarda la riduzione delle frequenze in base a quanto espresso nel Regolamento (CE) n. 2073 del 2005, nel caso in cui il campionamento (con cadenza ogni 2 settimane) per la conta delle colonie aerobiche, di Enterobacteriaceae e di *Salmonella* dia 3 risultati sfavorevoli consecutivi, la frequenza torna ad essere settimanale fino al ripristino delle condizioni igieniche precedenti.

Per le modalità di trasporto dei campioni, conservazione ed inizio analisi, l'Intesa Stato-Regioni sulle Linee guida del Regolamento 2073/2005 rimanda al Regolamento (CE) n. 882/2004. L'articolo 11 di detto Regolamento infatti sancisce che in assenza di norme comunitarie si faccia riferimento a protocolli riconosciuti a livello internazionale, come CEN o ISO. Pertanto in questo caso è utile adeguarsi a quanto riportato

nella norma ISO 7218:2007). I laboratori esterni ai quali vengono recapitati i campioni per l'analisi devono essere accreditati ai sensi della norma ISO 17025:2005 sui requisiti per i laboratori di analisi e taratura. Pertanto le prove di laboratorio dovranno far riferimento alle procedure ISO indicate nel Regolamento (CE) n. 2073/2005. D'altra parte, anche i laboratori interni agli stabilimenti nei quali vengono effettuati i prelievi operano secondo le corrette prassi di laboratorio.

Il prelievo deve essere eseguito dalla persona specificatamente incaricata e formata, individuata appositamente nel manuale di autocontrollo dell'impresa. Ai fini del campionamento non distruttivo delle carcasse di ungulati mediante l'impiego di spugnette sterili è necessario disporre di adeguati materiali e di attrezzature necessarie per la raccolta, la preparazione e l'invio dei campioni. Bisogna pertanto disporre di sapone e sostanze disinfettanti per le mani, di un piano di appoggio adeguato, di guanti sterili, di un delimitatore di area (100cm^2), di soluzione tampone sterile, oltre che spugnette, contenitori da trasporto, strumenti per la disinfezione del delimitatore ed etichette per l'identificazione del campione. Le soluzioni tampone utilizzate per la conservazione del campione durante il trasporto deve essere verificata prima dell'uso per l'assenza di torbidità, flocculazioni, detriti o altre formazioni estranee. Il laboratorio per l'esecuzione delle analisi deve garantire la sua disponibilità a processare i campioni in tempi brevi, entro le 24 ore dal momento del

prelievo, a condizione che il campione sia mantenuto refrigerato. Le carcasse da testare devono infine essere scelte secondo un metodo che assicuri l'assoluta casualità: per tale fine si può disporre di tavole di numeri casuali, programmi informatici generatori di numeri casuali o qualsiasi altro metodo che assicuri questo risultato.

Predisposizione dell'Autocontrollo aziendale nelle industrie di macellazione suine

La Determinazione Nazionale del 13 Gennaio 2005 fornisce alle aziende che rientrano nel settore delle carni e alle autorità competenti elementi pratici per la predisposizione e la messa in atto dei piani di autocontrollo, riservando una sezione particolare all'individuazione dei pericoli legati alla macellazione dei suini. Sebbene la normativa vigente preveda l'applicazione di procedure di analisi dei pericoli e gestione dei punti critici di controllo secondo il modello HACCP, questa non fornisce gli elementi pratici applicativi per la predisposizione dei manuali di autocontrollo. Pertanto si consente l'utilizzo di manuali di corretta prassi igienica come guida per gli operatori del settore alimentare, dopo valutazione da parte dell'autorità competente. Tuttavia ogni industria alimentare è tenuta a condurre uno studio dettagliato dei propri prodotti e processi, in modo da garantire che il piano sia adattato specificatamente alle proprie esigenze. È peraltro opportuno chiarire che l'HACCP deve essere inteso come un sistema in evoluzione, sia in termini di contenuti che nelle fasi applicative.

In linea di massima il piano di autocontrollo deve essere finalizzato alla prevenzione delle cause di insorgenza delle non conformità prima che queste si verifichino e all'applicazione delle opportune azioni correttive in

modo da minimizzare i rischi nel caso in cui, nonostante l'applicazione delle misure preventive, si verifichi una perdita di controllo. In questa direzione deve essere precisato che il sistema HACCP si adatta bene a strutture che già abbiano introdotto al loro interno procedure finalizzate ad un controllo di più fasi del processo produttivo (le cosiddette misure "trasversali"), che devono essere previste con appositi protocolli definiti pre-requisiti. Il documento che riassume il programma aziendale di autocontrollo deve essere quindi costituito da due capitoli: 1) le procedure di gestione delle attività produttive (SOP); 2) il piano HACCP. I requisiti preliminari all'implementazione dell'HACCP sono procedure di autocontrollo propedeutiche all'applicazione del modello HACCP e devono contenere le informazioni di seguito definite.

Le informazioni generali propedeutiche al manuale di autocontrollo

I dati aziendali comprendono la definizione dei prodotti e delle materie prime utilizzate nella lavorazione, i volumi di produzione, eventuali periodicità o stagionalità delle lavorazioni, l'organigramma aziendale. Questi elementi sono essenziali per dimensionare realisticamente gli interventi nell'ambito delle procedure di autocontrollo.

Deve essere eseguita una precisa identificazione di aree, impianti ed attrezzature per facilitare la descrizione del processo produttivo, dei relativi

diagrammi di flusso e dell'esatta localizzazione dei punti critici di controllo lungo il processo. Allo stesso modo è molto utile per qualsiasi tipo di verifica pre - operativa, di richiesta di manutenzione, per il rilevamento delle non conformità riferirsi allo schema di identificazione stabilito. Questo sistema è assolutamente libero e ogni ditta può procedere nel modo che ritiene più opportuno. Di norma le aree soggette ad identificazione sono: le aree esterne e i locali per il deposito o la lavorazione di sottoprodotti e dei rifiuti; le aree di carico e scarico merci; i corridoi e le altre aree di transito; i locali di deposito; i locali di lavorazione, compresi quelli di stoccaggio; le aree di vendita; i locali di servizio (spogliatoi, servizi igienici). Per quanto riguarda le attrezzature che devono essere identificate, si deve prestare attenzione a: impianti per la distribuzione, lo stoccaggio e la potabilizzazione dell'acqua; apparecchiature per la produzione di vapore; strutture per lo smaltimento dei reflui; impianti di refrigerazione; impianti elettrici ed eventuali gruppi di continuità. Sono tuttavia soggetti ad identificazione tutti gli impianti e le attrezzature impiegate in lavorazione.

Le procedure di gestione delle attività produttive (SOP)

Devono essere stilate le procedure relative ai pre-requisiti, definite anche SOP (Procedure Operative Standard) o procedure delocalizzate (seppure non siano sinonimi in senso stretto), che individuano attività che

intervengono trasversalmente al processo produttivo e che sono fondamentali nella gestione di alcuni pericoli e per la sicurezza degli alimenti. Pertanto devono essere sviluppate, realizzate e documentate procedure interne che controllino le condizioni operative in uno stabilimento, permettendo che le condizioni ambientali siano favorevoli alla produzione di alimenti sicuri. L'efficace implementazione di questi elementi è essenziale per il successo del piano HACCP, dato che in sede di analisi dei pericoli molti di questi potrebbero essere già controllati e gestiti attraverso queste procedure. Pertanto in definitiva determinati pericoli potrebbero non essere presi in considerazione, contribuendo ad una significativa semplificazione del piano HACCP. In riferimento ai pericoli fisici e chimici inoltre, la corretta applicazione dei pre-requisiti può garantire il controllo di questi rischi difficilmente gestibili a livello delle singole fasi del processo. Queste procedure devono essere pianificate, documentate, applicate e monitorate in modo sistematico, anche se non è richiesta la medesima puntigliosità nelle registrazioni e i gradi di controllo e verifica richiesti per l'HACCP. Tuttavia la loro applicazione di queste deve essere adeguatamente registrato. I singoli stabilimenti devono disporre di SOP specifiche adatte alla realtà aziendale. Di norma le principali procedure inserite nel manuale di autocontrollo aziendale riguardano:

- la pulizia e la disinfezione;
- il controllo degli animali infestanti;

- il controllo della potabilità delle acque;
- la formazione del personale;
- la gestione dei rifiuti;
- la manutenzione delle strutture e degli impianti;
- i controlli igienico-sanitari sul personale;
- la selezione e la verifica dei fornitori.

Per la redazione delle SOP possono essere utilizzate le GMP (Good Manufacturing Practices – Buone Pratiche di Lavorazione). Sono queste indicazioni generiche per aiutare a fabbricare prodotti sicuri, non destinate a controllare rischi specifici e non riferibili ad un singolo impianto. Ciò che differenzia principalmente le GMP dalle procedure implementate all'interno dell'impianto è quindi la relativa documentazione, dato che l'applicazione delle GMP di norma non prevede un monitoraggio pianificato e le relative registrazioni. Le procedure infatti descrivono una sequenza logica di attività da svolgere per garantire il raggiungimento di un determinato scopo. In linea generale ogni procedura deve definire con chiarezza:

- Lo scopo e il campo di applicazione;
- Le responsabilità e l'autorità del personale coinvolto;
- Le modalità operative;

- Quali informazioni, attrezzature, prodotti, personale sono necessari e quali risultati devono essere raggiunti;
- Quale documentazione utilizza e quali registrazioni produce.

In particolare devono essere chiaramente esplicitati i parametri di attività, le azioni di monitoraggio, correttive e di verifica. Anche nel caso in cui le operazioni descritte vengano condotte da una ditta esterna, il responsabile della loro implementazione e del loro mantenimento è tenuto a effettuare una verifica periodica circa il rispetto del protocollo concordato.

Le procedure di pulizia e disinfezione - devono basarsi su un protocollo finalizzato all'esecuzione delle pratiche di pulizia e disinfezione delle strutture, degli impianti, delle attrezzature e delle superfici di lavoro. In particolare deve specificare: i prodotti e gli utensili utilizzati; le modalità di pulizia e disinfezione distinte per aree e attrezzature, quindi il diagramma di flusso degli interventi (pre-operativi ed operativi), le concentrazioni e le modalità d'uso dei prodotti, i relativi tempi di contatto, nonché i tempi di esecuzione; la frequenza degli interventi; le modalità di controllo e di verifica con la determinazione dei limiti di accettabilità; le azioni correttive da attuare nel caso in cui si verificano delle non conformità e le misure preventive per evitare il loro ripresentarsi; i responsabili dell'attuazione. In aggiunta la procedura deve distinguere le operazioni ordinarie e straordinarie. Le prime sono quelle che vengono

condotte con frequenza stabilita e sistematica, secondo la programmazione preventiva e a prescindere dai risultati del controllo o eventi esterni. Il termine “ordinario” deve essere inteso in relazione alla sistematicità e alla programmazione, non legato alla frequenza. Invece le operazioni straordinarie sono quelle previste quando si determini la necessità di un intervento di pulizia o di disinfezione non previsto nel piano ordinario, a causa delle risultanze dell’autocontrollo o di eventi esterni. Oltre alle operazioni effettuate al termine delle lavorazioni è importante specificare anche le procedure in corso di lavorazione, compresi gli eventuali interventi attuati tra un turno di lavoro e il successivo o durante le pause. Altri elementi parimenti importanti sono le specifiche sull’igiene del personale nel corso delle lavorazioni (modalità e frequenza per il lavaggio e la disinfezione delle mani, dei dispositivi di protezione personali, dei coltelli, degli altri utensili e dell’abbigliamento), sulle procedure di risanamento da adottare nei casi di contaminazione diretta delle carni e sugli interventi a carico delle attrezzature a seguito di contaminazione accidentale delle stesse.

Per la dimostrazione dell’attuazione di tali procedure, l’azienda si deve avvalere di documentazione adeguata. In primo luogo deve essere individuato il responsabile per l’implementazione ed il mantenimento, deve essere allegata alla procedura la planimetria dell’impianto e devono essere inserite le schede tecniche dei prodotti utilizzati. Questa scheda informativa

riporta il nome della ditta produttrice e l'etichetta, la descrizione delle caratteristiche fisiche e la composizione chimica, per individuare eventuali sostanze incompatibili e prodotti nocivi di decomposizione. Inoltre la scheda tecnica deve precisare il campo di applicazione, il dosaggio e le modalità d'uso. Molto importanti sono anche i dati tossicologici relativi, accompagnati da simboli di pericolo e possibili effetti nocivi a seguito di inalazione, contatto con le mani, gli occhi e la pelle, integrati possibilmente da indicazioni relative al primo soccorso.

Infine devono essere presenti precauzioni e raccomandazioni per il trasporto e il magazzinaggio dei prodotti, o misure da adottare a seguito di perdite o rotture dei contenitori. Inoltre, per i disinfettanti, è opportuno allegare apposita documentazione che attesti l'efficacia del prodotto per la riduzione della carica batterica *in vitro*.

La documentazione delle SSOP (Procedure Operative Standard di Sanificazione) deve comprendere inoltre il protocollo di pulizia e disinfezione sia pre-operativo che operativo, i relativi piani di verifica e i limiti di accettabilità. Sia a seguito degli interventi di controllo che di verifica devono essere prodotte le registrazioni con i relativi esiti, potendosi avvalere di apposite check-list. La documentazione è richiesta anche per attestare la formazione specifica del personale. Nel caso di non conformità deve essere previsto un piano di azione che faccia riferimento ad un intervento straordinario e devono essere registrate le azioni correttive. Il

piano di verifica serve a dimostrare l'efficacia della procedura di pulizia e disinfezione adattata al tipo di lavorazione e all'intensità della produzione.

Sia in fase operativa che pre-operativa, il responsabile deve pertanto ispezionare le modalità operative degli addetti in applicazione del protocollo, i risultati ottenuti e la correttezza della documentazione prodotta. Inoltre deve essere previsto un programma di campionamento per il controllo microbiologico delle superfici, specificando i punti di prelievo, i metodi utilizzati, i limiti di accettabilità, le azioni correttive da intraprendere a seguito di non conformità. Anche la verifica deve essere preventivamente validata e i dati relativi devono essere registrati e conservati.

Particolare rilevanza rivestono i controlli pre-operativi allo scopo di fare iniziare le lavorazioni in condizioni igienico-sanitarie accettabili. Per facilitare il compito e non tralasciare nessun elemento è opportuno avvalersi di check-list pre-operative. Nel corso di questo controllo devono essere ispezionati i locali, gli impianti e le attrezzature da utilizzare (sulla base del diagramma di flusso), i locali di servizio, il personale addetto alla lavorazione e alla manipolazione degli alimenti.

Controllo degli animali infestanti ed indesiderati - la procedura è di fondamentale importanza per la prevenzione di eventuali contaminazioni dirette o indirette degli alimenti da parte di escrementi,

parassiti o delle sostanze chimiche eventualmente utilizzate. Per animali infestanti si intendono insetti, acari, roditori, rettili, uccelli mentre gli animali definiti indesiderati sono cani e gatti. La procedura deve prevedere sia misure preventive, ostacolando l'ingresso e l'insediamento degli animali, sia misure repressive, per eliminare quelli già penetrati nello stabilimento utilizzando mezzi idonei, di natura chimica, fisica e meccanica.

Le misure preventive comprendono: l'idonea realizzazione e manutenzione degli edifici, l'assenza di fessure tra i raccordi delle porte e i pavimenti o le pareti, l'isolamento dei condotti di alloggiamento di utenze elettriche o telefoniche, l'installazione di reti anti-insetto alle finestre, la corretta gestione dei rifiuti e dei sottoprodotti (evitando una loro permanenza ingiustificata all'interno dell'azienda o delle aree di produzione), la manutenzione delle aree interne ed esterne per renderle inadatte alla permanenza di animali infestanti attraverso il taglio periodico dell'erba e l'allontanamento dei materiali di scarto dall'area perimetrale.

Per quanto riguarda le misure repressive invece è sconsigliato in linea di massima l'utilizzo di presidi chimici per la disinfestazione all'interno dei locali di lavorazione e deposito alimenti. Peraltro è necessario un adeguato programma di monitoraggio per valutare l'eventuale presenza di animali infestanti, l'efficacia degli interventi e quindi il bisogno di intraprendere azioni correttive opportune. La documentazione che ne deriva, oltre alle

indicazioni generali valide per tutte le procedure, deve riportare l'identificazione delle aree da trattare, allegando la planimetria dell'impianto con l'indicazione dei punti dove vengono posizionate le esche e le trappole. Deve essere redatta una scheda relativa ad ogni intervento, che riporti le osservazioni condotte e gli interventi effettuati, e una relazione periodica che riporti i risultati dei trattamenti e delle eventuali azioni intraprese in caso di situazioni sfavorevoli. Ne caso ci si avvalga dei servizi di una ditta esterna deve essere allegato il contratto.

Controllo della potabilità dell'acqua - la procedura serve a garantire che l'acqua utilizzata all'interno degli stabilimenti sia potabile, con l'eccezione di quella impiegata per la produzione di vapore, per la lotta antincendio e per il raffreddamento degli impianti frigoriferi, purché le relative condutture siano chiaramente distinguibili e non consentano usi diversi. Il responsabile è tenuto a effettuare periodici controlli per verificare il rispetto dei limiti microbiologici e chimici previsti dalla normativa vigente (DLgs. n. 31 del 2001), già trattata in precedenza nel capitolo 1. Al fine di eseguire in autocontrollo le verifiche periodiche sull'idoneità dell'impianto di distribuzione dell'acqua, deve essere predisposta una planimetria che riporti l'indicazione e la numerazione dei punti di erogazione dell'acqua potabile, il tracciato della rete idrica interna ed evidenziazione delle tubazioni di acqua non potabile. Deve essere stabilita

una programmazione dei campionamenti per i controlli da effettuare presso un laboratorio riconosciuto per l'esame microbiologico e chimico, nonché la natura degli accertamenti, i limiti di accettabilità e i provvedimenti da attuare. I prelievi devono essere fatti a rotazione dai diversi punti di erogazione. La frequenza generalmente è in funzione dell'origine delle acque, dalla presenza di depositi intermedi e dal volume totale delle produzioni. I rapporti di analisi devono essere conservati per un periodo idoneo.

Manutenzione ordinaria e straordinaria - la procedura deve garantire che lo stabilimento è localizzato, costruito e mantenuto secondo i principi delle buone pratiche igieniche. Lo scopo è quello di prevedere flussi produttivi lineari e una loro gestione tale da minimizzare il rischio di contaminazioni crociate. Pertanto questa procedura serve a mantenere i requisiti strutturali e funzionali sulla base dei quali lo stabilimento è stato riconosciuto ed autorizzato. Le operazioni di manutenzione ordinaria devono essere programmate mentre il costante monitoraggio dello stato di conservazione delle strutture e di usura delle attrezzature permette la verifica dell'adeguatezza del piano stesso. Per questo motivo si può evidenziare la necessità di attuare interventi di manutenzione straordinaria, che possono comportare la temporanea riduzione o sospensione dell'attività produttiva. Le operazioni di manutenzione riguardano generalmente: le

aree esterne allo stabilimento; le strutture sia interne che esterne; i servizi ausiliari; gli impianti; le attrezzature fisse e mobili; i mezzi di trasporto degli alimenti. Gli strumenti di misurazione, come termometri, bilance e pH-metri devono essere sottoposti a periodica verifica di funzionalità e taratura.

Controllo delle temperature - la procedura comprende la verifica del rispetto delle temperature di stoccaggio, di lavorazione e di trattamento termico dei prodotti alimentari. È importante controllare e registrare la temperatura nelle celle frigorifere per la conservazione delle carni fresche, per la conservazione degli alimenti surgelati, nei laboratori di sezionamento delle carni fresche, carni macinate e preparazioni di carne, nei locali adibiti al sezionamento e alla salatura in profondità di prodotti a base di carne. Negli impianti per trattamenti termici quali la pastorizzazione, la sterilizzazione, è importante registrare oltre alla temperatura anche i tempi di esposizione per valutarne l'efficacia. Tuttavia l'azienda può prevedere il monitoraggio anche di altri locali ed impianti, qualora tale attività sia essenziale per la sicurezza degli alimenti. In ogni caso le condizioni ambientali devono essere tali da garantire le rispetto delle temperature previste dal Regolamento n. 853/2004 e dal DPR n. 327/1980, per gli alimenti non specificati dal Regolamento comunitario. Ai fini della registrazione delle temperature possono venire utilizzati termometri con

registrazione continua su nastro o dischetto settimanale o teletermometri registratori collegati a sistemi centralizzati. La registrazione manuale può essere impiegata allo scopo di verificare l'esattezza delle registrazioni strumentali, ma non può essere utilizzata in sua sostituzione, qualunque sia la frequenza. Qualora la registrazione non sia continua ma intermittente, l'intervallo tra una registrazione e l'altra deve garantire la possibilità di intervenire in tempo utile con idonee misure correttive. Queste devono essere previste in relazione alla durata e alla gravità dell'inconveniente registrato. Sulla base di questa valutazione i prodotti possono essere bloccati e la situazione comunicata al servizio veterinario, oppure ci può essere una rapida risoluzione dell'inconveniente e la conseguente liberalizzazione dei prodotti, previa valutazione dell'impatto dell'abuso termico. In aggiunta a questi provvedimenti ci può essere la sospensione della lavorazione fino al ripristino delle condizioni adeguate, il ritiro dal mercato dei prodotti per rischi rilevanti per la salute pubblica o la rilavorazione o la destinazione ad uso non alimentare dei prodotti ritirati dal mercato o trattenuti in azienda.

Formazione personale - il programma fornisce al personale addetto alla lavorazione degli alimenti un'adeguata preparazione sui principi igienici generali e sui pericoli derivanti da una scarsa igiene personale o da comportamenti scorretti. A tal fine il personale supervisore

deve necessariamente possedere un buon livello di conoscenze per rilevare le carenze igieniche o la contaminazione dei prodotti alimentari. Deve essere predisposto pertanto un programma di formazione tecnico-sanitaria del personale, articolato a diversi livelli in relazione al livello di conoscenza personale e alle specifiche mansioni. Questi criteri sono utili per stabilire i contenuti delle attività formative, per evitare eccessi o carenze e per garantire il livello minimo necessario a fornire la consapevolezza sui rischi connessi alle proprie attività, sui metodi per prevenirli e sulle procedure aziendali connesse all'autocontrollo. La predisposizione di test o colloqui è importante per desumere lo stato di conoscenze già posseduto e per valutare l'efficacia delle attività. Gli argomenti trattati dovrebbero essere inerenti per lo meno all'igiene del personale e delle attrezzature, alle procedure aziendali correlate all'autocontrollo, ai principi di comportamento con riferimento alle azioni correttive in caso di inconvenienti, a nozioni sul benessere animale per gli addetti alla macellazione.

Nel caso in cui si impieghi personale avventizio o stagionale o con elevato turn-over, devono essere comunque garantite le conoscenze di base dei principi di igiene. Se non è possibile la frequentazione di appositi corsi si può ricorrere alla distribuzione di opuscoli, all'affiancamento iniziale con personale esperto e ad altre iniziative utili allo scopo. Anche in questa procedura deve essere esplicitata la periodicità dell'aggiornamento e

devono essere documentate tutte le attività di formazione svolte (data, durata, temi, presenze, docenti, test). Inoltre devono essere chiaramente indicati i criteri di valutazione e le azioni correttive da applicare in caso di risultati negativi. La valutazione finale in ogni caso deve avvenire sul campo per riscontrare eventuali carenze, che saranno oggetto di aggiornamenti formativi.

Selezione e verifica dei fornitori - la procedura riveste un ruolo determinante sui risultati finali della produzione, dato che serve a valutare le materie prime utilizzate, compresi i semi-lavorati e i servizi acquistati. È opportuno pertanto che l'azienda predisponga un elenco di tutte le principali materie prime utilizzate, identificando i prodotti e le quantità annue presunte. Deve essere previsto un registro per il censimento di tutti i fornitori abituali con apposite schede di "registrazione fornitore". Il sistema più efficace per la selezione del fornitore consiste nella verifica dalle garanzie fornite dal suo sistema di autocontrollo. Sono da fissare per questo scopo le caratteristiche fisiche, chimiche e microbiologiche delle materie prime alle quali il fornitore si deve conformare. I risultati delle verifiche, che possono essere documentali, ispettive, strumentali o analitiche, devono essere registrati ed in caso l'esito sia negativo devono essere stabilite le misure da intraprendere.

Ritiro dal mercato delle merci non idonee - la procedura consente di rintracciare e richiamare dal mercato i prodotti che sono stati individuati come potenzialmente pericolosi per il consumatore. La procedura fissa come attribuire l'identificazione ai lotti di produzione, intesi come insieme di unità di vendita di una derrata alimentare prodotte, fabbricate o confezionate in circostanze praticamente identiche. I criteri di attribuzione che sono adottati possono riguardare le materie prime impiegate, la produzione giornaliera, la linea di produzione, le condizioni di stoccaggio, la destinazione commerciale dei prodotti e la data di scadenza o il termine minimo di conservazione. Gli strumenti imprescindibili per avviare procedure di ritiro dal mercato di prodotti potenzialmente pericolosi sono un elenco aggiornato e dettagliato dei clienti e registrazioni opportune per risalire al destinatario di ciascun lotto immesso sul mercato. In ogni caso ci deve essere una rapida informazione al cliente in caso di pericoli. Si può capire quanto sia importante mantenere e registrare correttamente l'identificazione degli animali avviati alla macellazione, avvalendosi anche dei modelli sanitari che scortano gli animali al macello.

Controlli igienico-sanitari sul personale – la procedura deve prevedere controlli ad una cadenza periodica e deve descrivere le azioni da intraprendere in caso di esiti sfavorevoli, oltre che i sistemi di riammissione

al lavoro dopo malattie infettive. L' idoneità del grado di igiene personale e dell' abbigliamento deve essere valutata da un responsabile, che disciplini le modalità di accesso alle aree produttive, gli indumenti da lavoro consentiti e lo stoccaggio di questi in azienda. Per la gestione del vestiario da lavoro interno pertanto ci si può avvalere di un contratto con la ditta esterna che provveda alla fornitura di divise pulite.

Gestione dei rifiuti e delle emissioni - la procedura fissa un protocollo di smaltimento per residui, rifiuti e eventuali materiali specifici a rischio. È necessario esplicitare le modalità di identificazione, i tipi di contenitori utilizzati e le modalità di gestione all'interno dello stabilimento, che comprendano sia lo smaltimento che l'eventuale trattamento. Sono da identificare le aree di stazionamento e di stoccaggio, le modalità con le relative frequenze di verifica sugli scarichi. A tal proposito è utile descrivere tutti i tipi di rifiuti ed emissioni e le relative modalità di gestione, disporre delle autorizzazioni agli scarichi e alle emissioni e il mantenimento di registrazioni inerenti la produzione e l'invio dei rifiuti secondo i canali autorizzati o ditte specializzate.

Definizione della conservabilità dei prodotti (shelf-life) - la procedura è necessaria, essendo strettamente correlata alla sicurezza degli alimenti. Per l'attribuzione della data di scadenza o del termine minimo di

conservazione bisogna tenere conto delle caratteristiche chimico-fisiche del prodotto, della tipologia del confezionamento, degli additivi impiegati, dei trattamenti di conservazione, della temperatura di stoccaggio e dell'esperienza maturata dall'industria alimentare o da dati desunti dalla letteratura scientifica. Chiaramente la conservabilità di alimenti deperibili può essere stabilita mediante prove di conservazione effettuate da laboratori specializzati e sulla base di informazioni tecnico-scientifiche documentate o dati storici. È senz'altro utile anche il ricorso a modelli matematici di crescita microbica.

Il Sistema HACCP

Il secondo capitolo del manuale di autocontrollo aziendale riguarda l'HACCP, che è un sistema di controllo largamente utilizzato al fine di garantire la sicurezza dei processi di produzione alimenti. L'obiettivo viene raggiunto, come già spiegato, attraverso una sistematica valutazione dei pericoli, lo sviluppo di sistemi di controllo e l'adozione di misure preventive, piuttosto che tramite il controllo del prodotto finito.

Nella conduzione dell'analisi dei pericoli per la sicurezza della carne suina, è necessario stabilire quelli che possono ragionevolmente verificarsi ed identificare le misure che possono essere applicate per la loro gestione. Deve essere preso in considerazione qualsiasi pericolo che, in base alla letteratura o all'esperienza dello stabilimento, si sia presentato

precedentemente nello stesso tipo di prodotto. Tuttavia, il fatto che un pericolo abbia in teoria la probabilità di presentarsi, non significa che automaticamente lo stesso debba essere gestito attraverso un Punto Critico di Controllo (CCP). L'azienda deve comunque giustificare per quali ragioni nel proprio stabilimento quel pericolo, preso in considerazione in base ai dati della letteratura, non ha ragionevolmente la probabilità di verificarsi. La documentazione utilizzata nello sviluppo dell'analisi dei pericoli deve essere conservata a supporto o giustificazione delle scelte attuate, come ad esempio la legislazione di riferimento, gli studi scientifici, gli studi sviluppati internamente all'azienda e i dati storici. Si devono individuare quei pericoli che potrebbero insorgere in ciascuna fase del processo produttivo, utilizzando il diagramma di flusso e la descrizione della materia prima.

Una delle difficoltà maggiori consiste nello stabilire quali pericoli possono ragionevolmente verificarsi e per quali è necessario adottare misure preventive. Per ovviare a questo ostacolo occorre scindere l'analisi dei pericoli in tre momenti distinti. In una prima fase vanno elencati tutti i potenziali pericoli biologici, chimici o fisici che potrebbero insorgere prevedibilmente in ciascuna fase. In un secondo momento è necessario determinare il livello di significatività. Alla fine vanno elencate le misure preventive per controllare e gestire i rischi identificati. I pericoli di norma sono raggruppati per semplicità in tre categorie, biologici, chimici, fisici, e

possono essere definiti in modo specifico o possono essere raggruppati quando la fonte di contaminazione piuttosto che le modalità di gestione siano sovrapponibili. Focalizzando l'attenzione sui pericoli biologici, si possono incontrare organismi viventi come batteri, parassiti e virus. I pericoli biologici sono associati frequentemente alla materia prima dalla quale l'alimento è derivato, in questo caso il suino, ma possono essere introdotti durante la lavorazione dall'ambiente nel quale l'alimento è prodotto o dagli addetti alle lavorazioni e dal processo di macellazione stesso. Sulla base della Determinazione Nazionale 13/01/2005, vengono individuati come pericoli biologici associati alla macellazione suina *Bacillus cereus*, *Campylobacter* spp. (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*), *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, diversi patotipi di *Escherichia coli* (enteropatogeni, enteroinvasivi, enterotossigeni, enteroemorragici), *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Staphylococcus aureus*.

Nell'allegato B della Determinazione 13/01/2005, parte 2, capitolo 1.2 relativo al suino, si riporta che *Listeria monocytogenes* è un germe ubiquitario, presente nel suolo e nell'intestino dell'uomo e degli animali. Può persistere per lunghi periodi nell'ambiente creando nicchie di colonizzazione di difficile eradicazione, pertanto sono da tenere in forte considerazione sia l'ambiente di lavorazione che le attrezzature come fonte

di possibile contaminazione. Inoltre è in grado di moltiplicarsi anche a temperature di refrigerazione, rendendo questa misura meno efficace per ridurre la crescita. La carne fresca è un substrato di crescita idoneo per il microrganismo, sulla base delle sue caratteristiche chimico-fisiche di pH e attività dell'acqua (A_w). Il consumo di prodotti a base di carne contaminati da *Listeria monocytogenes* è associato a forme setticemiche, caratterizzate da alta mortalità e gravi sequele, e a forme di listeriosi non invasiva, caratterizzate da sintomatologia gastro-intestinale, con i sintomi che possono variare da febbre, diarrea, dolori muscolari e, con minor frequenza, crampi addominali e vomito. La carica infettante è ritenuta essere in relazione all'ospite, essendo maggiormente vulnerabili determinate categorie a rischio, quali immunocompromessi, donne in gravidanza, bambini, soggetti anziani.

Salmonella spp. invece è presente nell'intestino dell'uomo e di molti animali, anche senza causare malattia. Questi soggetti possono pertanto fungere da portatori spesso asintomatici e diffondere il microrganismo nell'ambiente, dove può sopravvivere anche per lunghi periodi. *Salmonella* spp. è tra le cause più frequenti di malattia ad origine alimentare in Europa e uno degli agenti batterici di origine alimentare con incidenza più elevata nel mondo. Il suino viene considerato uno dei maggiori serbatoi di *Salmonella* spp. La contaminazione avviene in maniera prioritaria per via fecale, anche se il batterio potrebbe essere presente sulla cute degli animali

prima del loro ingresso alla macellazione. Il mancato rispetto delle misure igieniche durante le lavorazioni può essere la causa di diffusione di *Salmonella* spp. lungo la catena di macellazione tra soggetti diversi attraverso un meccanismo di contaminazione crociata. Anche la presenza di portatori asintomatici tra il personale che manipola le carni può essere una fonte di contaminazione dei prodotti, se non vengono seguite rigorose misure di corretta prassi igienica. La malattia nell'uomo, sebbene si presenti frequentemente con una forma febbrile gastro-intestinale a decorso benigno, coinvolge un numero elevato di persone ogni anno. I costi diretti ed indiretti ad esse connessa mantengono l'infezione da *Salmonella* spp. al centro dell'attenzione, soprattutto alla luce del fatto che le carni e i prodotti a base di carne suina sono stati frequentemente identificati come causa di tossinfezioni umane.

Volendo determinare il livello di significatività di questi due pericoli biologici, si deve effettuare la valutazione del rischio (risk assessment), in relazione al processo di macellazione, al personale e alla frequenza di malattia nell'uomo, e la determinazione della gravità della malattia (severity), che a differenza del "risk" dipende dalle caratteristiche intrinseche dell'agente determinate il pericolo. Generalmente devono essere considerati nell'HACCP i rischi ad elevata gravità o frequenza, o con le due caratteristiche ad un livello intermedio. La valutazione che viene fatta è generalmente basata su una combinazione di esperienza, dati

epidemiologici e dati desunti dalla letteratura scientifica. Sulla base di quanto espresso nella Determinazione 13/01/2005, sia *Salmonella* spp. che *Listeria monocytogenes* sono da ritenersi entrambi significativi, il primo microrganismo per motivi legati all'elevato tasso di malattia nell'uomo, anche se spesso caratterizzato da ridotta severità, il secondo per la gravità della patologia, seppure contraddistinta da una bassa frequenza.

L'ultimo step relativo alla conduzione dell'analisi dei pericoli è relativo all'individuazione delle misure preventive per controllare o gestire i rischi identificati. È da tenere presente che per gestire un pericolo può essere necessario ricorrere a più di una misura preventiva e allo stesso modo la medesima misura preventiva può intervenire su più pericoli. Per lo sviluppo dell'analisi dei pericoli può essere utilizzato il modulo riportato in Figura 6. Detto modulo è utile per evidenziare, attraverso apposita colonna, le misure che nell'ambito dei pre-requisiti (GHP e GMP) possono gestire il pericolo stesso prima di stabilire se un pericolo può ragionevolmente verificarsi.

1	2	3	4	5	6	7
Fase	Pericolo identificato	Giustificazione/ motivazioni	Quali misure sono state adottate nei prerequisiti per controllare/gestire il pericolo?	Dopo l'applicazione di tali misure, è un pericolo che ragionevolmente può verificarsi? Se sì, fornire le motivazioni	Se la risposta alla domanda 5 è sì: quali misure possono essere applicate per prevenire, eliminare o ridurre il pericolo ad un livello accettabile?	CCP
...
...

Figura 6: schema riassuntivo per l'analisi dei pericoli ed identificazione dei CCP (Determinazione Nazionale 13/01/2005).

In parole semplici lo schema è utile per determinare se un pericolo è gestito in modo idoneo già a livello di programmi pre-requisito e non necessita pertanto di un controllo più complesso e oneroso all'interno dell'HACCP, con la fissazione di specifici CCP. È evidente infatti che una proliferazione ingiustificata di CCP porta ovviamente a rendere tutto il processo ingestibile. Per quanto possibile nel piano HACCP bisognerebbe individuare il minor numero di CCP, diversamente il piano è destinato a fallire. Non è peraltro detto che dopo implementazione corretta dei pre-requisiti, non possano essere prevenuti anche pericoli significativi, sottolineando ancora una volta l'importanza di far precedere l'adozione dei pre-requisiti allo sviluppo di un piano HACCP.

Un efficace piano HACCP deve basarsi su dati relativi al tipo e ai livelli di contaminazione batterica per ciascuna fase del processo di macellazione, in base ai quali si può valutare l'entità dei rischi per la sicurezza degli alimenti, che ciascuna fase presenta. I dati sono necessari a ciascuno stabilimento per applicare opportuni limiti critici, come mezzo per monitorare l'efficacia delle misure di controllo intraprese. Pertanto sebbene sia possibile implementare inizialmente un piano HACCP generico, adatto a tutti i processi di macellazione, è opportuno che ciascuno stabilimento sviluppi i propri dati di riferimento interni, per adattare il piano generico alle particolari circostanze e processi implementati.

Diagramma di flusso della macellazione suina

In uno stabilimento, generalmente, gli animali permangono nei locali di sosta prima di essere avviati alla catena di macellazione. Lo stordimento precede la iugulazione e viene effettuato utilizzando monossido di carbonio o l'elettronarcosi. Successivamente vengono recise le arterie carotidi e le vene giugulari, per ottenere un dissanguamento completo. Gli animali dissanguati sono fatti passare nelle vasche di scottatura per approssimativamente 6-8 minuti ad una temperatura dell'acqua di circa $61^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Questa operazione è utile per facilitare la successiva rimozione delle setole, che avviene facendo passare la carcassa sopra a rulli rotanti dotati di elementi raschianti. Le carcasse sono poi appese ad una

linea trasportatrice attraverso un gancio inserito a livello di tendine calcaneare. Il passaggio susseguente è rappresentato dalla flambatura, operazione che può essere automatizzata o manuale. Il passaggio attraverso le fiamme, ad una temperatura di circa 1200°C, ha una durata di 15 secondi e consente di raggiungere una temperatura superficiale di circa 100°C. Si passa così alla pulizia della superficie grazie al passaggio tra una serie di spazzole verticali e orizzontali per circa 5 minuti. In seguito la carcassa viene trasportata nell'area riservata all'eviscerazione. La prima fase comprende l'incisione attorno all'ano, utilizzando un coltello. Si incide quindi la parte ventrale, per consentire la rimozione del diaframma, del cuore, dei polmoni, della trachea e del pacchetto digerente. La carcassa può essere a questo punto separata con una sega in 2 mezzene lungo la linea mediana, partendo dagli arti posteriori (seguendo il senso dall'alto al basso). Gli organi precedentemente estratti, che sono stati appesi di fianco alla relativa carcassa, vengono esaminati durante la visita *post-mortem*. Una volta che tutte le operazioni sono eseguite, le carcasse, eventualmente lavate con acqua, vengono portate nelle celle frigorifere e mantenute ad una temperatura inferiore a 4°C.

Andamento delle contaminazioni microbiche lungo le varie fasi della macellazione suina

Pearce e collaboratori (2004) ha messo in luce l'andamento della contaminazione microbica sulla superficie degli animali macellati lungo le varie fasi della catena. Sulla base di parametri microbiologici, quali la conta mesofila aerobica e la numerazione dei coliformi, hanno potuto evidenziare le fasi più efficaci nel controllare i rischi microbiologici e quelle, al contrario, più esposte. Il passaggio nelle vasche di scottatura è associato ad una riduzione importante dei parametri considerati, assieme alla flambatura, anche se questa ha presentato differenze tra i punti della carcassa sottoposti a campionamento. L'area del collo infatti ha mostrato cariche microbiche molto più ridotte rispetto al ventre e alla coscia, forse per un'esposizione non omogenea della carcassa alle fiamme. Invece le fasi in cui si è registrato un aumento delle contaminazioni sono state, in ordine di importanza, la rimozione delle setole, la spazzolatura e l'eviscerazione, per la quale chiaramente l'area più a rischio è rappresentata dal ventre. A seguito del raffreddamento finale, le cariche microbiche si sono mantenute abbastanza stabili, se non per un leggero aumento, molto marcato solo per la regione giugulare (Pearce *et al.*, 2004). I due parametri microbici considerati hanno avuto riduzioni non proporzionali a livello di scottatura e flambatura, evidenziando una maggiore sensibilità al calore dei coliformi rispetto alla flora batterica generica. Questo ha portato i ricercatori ad ipotizzare una sottostima da parte dei metodi analitici dei coliformi, che

potrebbero essere stressati (e quindi con coltivabili con le metodiche analitiche classiche) a seguito dell'esposizione al calore (Pearce *et al.*, 2004). Inoltre *Salmonella* spp. è stata rilevata sul 31% delle carcasse al dissanguamento, mentre la prevalenza è scesa all'1% dopo la scottatura, dalla cui acqua non è stato possibile rinvenire il microrganismo. La rimozione delle setole ha riportato la presenza al 7% delle carcasse, mentre la flambatura appare eliminare completamente il rischio nelle aree adeguatamente esposte al calore. Tuttavia l'eviscerazione risulta essere un'operazione a rischio, con prevalenze di *Salmonella* spp. che si innalzano fino al 7%. Come si desume da questi risultati, appare chiaro che nell'industria di macellazione per la produzione di carne suina fresca i rischi microbiologici non possono essere completamente eliminati, ma solamente ridotti. Una fase ad alto rischio di contaminazione è sicuramente l'asportazione delle setole, che causa un innalzamento significativo delle cariche microbiche. Al contrario tra le fasi utili al controllo dei rischi c'è sicuramente la scottatura, efficace nella riduzione di batteri patogeni come *Salmonella* spp. Anche la flambatura si è dimostrata parimenti efficace, anche se si sono registrate delle differenze significative tra le aree campionate. Queste potrebbero essere legate al sistema di flambatura impiegato, sulla base del quale alcuni punti potrebbero essere maggiormente esposti al calore. Ad esempio una singola fiamma, se paragonata a ad un sistema automatizzato a più fonti, produce un effetto

disomogeneo (Pearce *et al.*, 2004). La flambatura eseguita manualmente si dimostra più efficace perché è applicata in modo più omogeneo a tutte le aree della carcassa, ottenendo riduzioni di contaminazione batterica più significative (Bolton *et al.*, 2002). Pertanto se in un piano HACCP si volessero considerare queste due fasi come CCP, sarebbe necessario standardizzare i processi in termini di temperatura e tempo di trattamento, dati che tuttora non sono disponibili. Gli aumenti di cariche microbiche a seguito di spazzolatura e soprattutto di rimozione delle setole potrebbero essere collegati alla ridistribuzione della contaminazione localizzata da aree delimitate o per fenomeni di cross-contaminazione attraverso detriti che si sono accumulati nelle attrezzature e nei macchinari (Pearce *et al.*, 2004). Infatti *Salmonella* può essere rinvenuta fino nel 50% dei campioni di detriti prelevati da una macchina per la rimozione delle setole e questo è dovuto soprattutto alla fuoriuscita di materiale fecale dall'ano durante il processo (Gill e Bryant, 1993). L'applicazione di un cono di plastica, pratica non applicata nelle attuali metodiche di macellazione in Italia, inserito nell'ano potrebbe prevenire le contaminazioni fecali e quindi ridurre la contaminazione di attrezzature e carcasse (Bolton *et al.*, 2002). Anche l'eviscerazione è da considerarsi una fase a rischio, soprattutto per quanto riguarda l'addome, per il pericolo *Salmonella* spp. o altri pericoli microbiologici legati allo stato di portatore dell'animale.

Infine le differenze numeriche, anche se non statisticamente significative, per i parametri considerati a seguito della refrigerazione, indicano che questa fase può essere utile solo nel contenere la crescita microbica, ma sicuramente non a ridurre i rischi. D'altra parte si possono osservare differenze significative in base alle diverse metodiche di raffreddamento, dimostrando che diversi fattori intrinseci all'animale, quali il peso della carcassa, la sua temperatura interna, il grado di copertura adiposa, e fattori estrinseci, come la temperatura della cella, la velocità dell'aria, l'umidità e lo spazio tra le carcasse, possono influenzare notevolmente i risultati di questa fase (Pearce *et al.*, 2004).

Simili risultati sono stati ottenuti anche da altri studi (Bolton *et al.*, 2002), che hanno messo in luce un andamento delle contaminazioni lungo la catena di macellazione praticamente sovrapponibile allo studio precedente. Quest'ultimo lavoro si è focalizzato soprattutto sia sull'efficacia del lavaggio esterno degli animali, applicato a diverse fasi della macellazione, che della refrigerazione. Il lavaggio è una possibile risposta al problema di imbrattamento superficiale degli animali da feci, residui di mangime e terriccio, che avviene durante il trasferimento degli animali al macello nei mezzi di trasporto e durante la permanenza nelle stalle di sosta. Bolton e collaboratori (2002) hanno osservato che il lavaggio effettuato sugli animali prima dell'ingresso nella catena di macellazione, produce un aspetto visibilmente pulito, anche se tuttavia non è associato ad una

riduzione della contaminazione microbica: può essere considerata quindi semplicemente un'azione puramente "estetica" sull'animale. Allo stesso modo i lavaggi applicati anche in fasi successive di macellazione e di lavorazione delle carcasse portano solo ad un peggioramento della contaminazione. Possibili spiegazioni per questo fenomeno possono essere legate alla deposizione sulla superficie bagnata di microrganismi presenti nell'aria del macello o ad un effetto di spargimento generalizzato di una contaminazione relegata ad un'area limitata della carcassa. Per ottenere effetti decontaminanti infatti è necessaria una temperatura dell'acqua di almeno 85°C (Bolton *et al.*, 2002), elemento da prendere in considerazione se si volesse inserire tale intervento nel piano HACCP. È importante inoltre sottolineare che questa efficacia potrebbe essere ulteriormente potenziata attraverso l'inserimento di determinati composti nell'acqua di trattamento, come il cloro e il fosfato trisodico (sostanze non ancora autorizzate per l'impiego all'interno dell'Unione Europea). Tuttavia suddetti trattamenti non sembrano poter fornire un adeguato livello di protezione al consumatore: in termini strategici il rischio *Salmonella* spp., ad esempio, dovrebbe essere contrastato più efficacemente riducendo la sua incidenza nell'animale che entra nella catena di macellazione, che rappresenta la fonte di contaminazione più importante. In questo senso agendo a livello di allevamento con norme di biosicurezza, si potrebbero ottenere aree non contaminate dal patogeno nel quale stabulare gli animali, proteggerli

dall'ingestione di acqua e mangimi contaminati e ottenere gruppi di animali esenti dall'infezione. Questi risultati avrebbero sicuramente un'efficacia ben maggiore della rimozione dei microrganismi dalla superficie delle carcasse (Bolton *et al.*, 2002). La refrigerazione delle carcasse invece potrebbe essere considerata un CCP perché previene la moltiplicazione dei batteri sulle superfici calde delle carcasse. Infatti, sebbene si registri un lieve incremento della conta mesofila aerobia, generalmente si ha una riduzione numerica di batteri Gram-negativi (Bolton *et al.*, 2002).

Analisi dei rischi legati alla macellazione suina

La macellazione suina è un processo aperto, che fornisce diverse opportunità per la contaminazione delle carcasse con batteri potenzialmente patogeni. Il processo peraltro include alcune fasi, grazie alle quali è possibile ridurre l'entità della contaminazione, ma tuttavia non esiste nessun punto di controllo in grado di eliminare completamente i rischi. Pertanto i CCP che vengono identificati lungo il diagramma di flusso possono garantire solo un controllo parziale e la capacità di prevenire i rischi appare limitata. Bisogna considerare inoltre che molto spesso è difficile individuare dei limiti critici o delle azioni correttive per determinati CCP, che quindi sono di fatto dei Punti di Controllo (CP) gestiti attraverso l'implementazione dei pre-requisiti e delle GMP. Borch e collaboratori (1996) hanno proposto lo schema riportato in Figura 7.

Salmonella spp. è considerata sicuramente tra i pericoli microbiologici, essendo tra le cause principali di malattia ad origine alimentare, con la forma non-tifoidea generalmente auto-limitante. Il rischio per la salute umana è identico per tutti i sierotipi conosciuti, per alcuni dei quali il suino è frequentemente portatore asintomatico: per questo motivo *Salmonella* spp. è riscontrata spesso sulle carcasse suine e nella carne di maiale (Bonardi S. *et al.*, 2003; Borch *et al.*, 1996). Sebbene possa essere rinvenibile lungo l'intero tratto digerente (rendendo il materiale fecale un'importante fonte di contaminazione), le concentrazioni di microrganismo possono variare molto da tratto a tratto. Inoltre il microrganismo è rinvenibile anche dalle tonsille, dal fegato, dal diaframma e dal tessuto linfatico associato all'intestino, che devono essere considerati possibili fonti di contaminazione e manipolati pertanto con tutte le precauzioni necessarie. In definitiva la fonte di contaminazione principale per *Salmonella* spp. è rappresentata dall'animale stesso, dalle attrezzature o dagli utensili contaminati (Borch *et al.*, 1996).

I microrganismi appartenenti al genere *Listeria*, ed in particolare *Listeria monocytogenes*, sono considerati di origine ambientale, dato che hanno le caratteristiche per colonizzare i locali di lavorazione e i macchinari, che rappresentano la fonte principale di contaminazione degli alimenti (Borch *et al.*, 1996; Thévenot *et al.*, 2006). Le operazioni di refrigerazione e sezionamento aumentano significativamente la

contaminazione della carne suina, vista anche la natura psicrotrofica del microrganismo. La prevalenza ambientale del patogeno nelle aree adibite a queste fasi possono variare dal 71-100% (Thévenot *et al.*, 2006), suggerendo che le operazioni successive alla macellazione sono una causa significativa di contaminazione della carne e che l'entità delle cariche microbiche è amplificata dai locali di sezionamento e refrigerazione (Thévenot *et al.*, 2006). *Listeria monocytogenes* può diventare stabile negli ambienti di lavorazione e sopravvivere per lunghi periodi, che possono essere quantificabili in 1-3 anni. Il microrganismo aderisce alle superfici inerti dei locali o delle attrezzature, creando biofilm come risultato dell'aderenza delle cellule libere di muoversi e della loro continua crescita nella matrice. L'ampiezza e la velocità di adesione tuttavia mostrano differenze in relazione al tipo di superficie, alle condizioni ambientali, ai trattamenti di pulizia e disinfezione e ai diversi sierotipi (Thévenot *et al.*, 2006).

L'origine della contaminazione delle carcasse suine si ritiene possa essere legata all'animale stesso quando avviene la rottura del grosso intestino durante l'eviscerazione. Tuttavia molto spesso *L. monocytogenes* è rinvenibile sulla carcassa, ma non nelle feci degli animali corrispondenti. Pertanto si può affermare che solo raramente la sua presenza è dovuta ad un'origine fecale, mentre è più probabile che i suini alberghino *L. monocytogenes* nelle tonsille (Thévenot *et al.*, 2006). La prevalenza del

microrganismo nelle feci o nel contenuto intestinale dei suini infatti si aggira su un valore pari allo 0,9% (valore minimo 0%, valore massimo 1,7%) secondo i dati disponibili in letteratura scientifica desunti da diversi studi (Bonardi S. *et al.*, 2002; Fosse *et al.*, 2009). *L. monocytogenes*, al contrario, è isolabile frequentemente dalle tonsille dei suini da macello, come dimostrato da Fredriksson-Ahomaa e collaboratori (2009). La prevalenza di *L. monocytogenes* nelle tonsille è stata pari al 32% degli animali macellati, pertanto molto maggiore a quella nelle feci (Fredriksson-Ahomaa *et al.*, 2009). Infine anche l'igiene personale può concorrere alla contaminazione della carne da *L. monocytogenes*, siccome alcune procedure semplici, come il mancato lavaggio delle mani, sono state identificate come un via di trasmissione del patogeno (Thévenot *et al.*, 2006).

In definitiva la trasmissione di *L. monocytogenes* alle carni non sembra seguire primariamente la via animale, ma sembra essere un pericolo legato alle condizioni igieniche dello stabilimento di macellazione. Pertanto *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* potrebbero essere degli indicatori molto utili per giudicare lo stato igienico generale e l'efficacia della procedure di pulizia e sanificazione adottate negli stabilimenti (Borch *et al.*, 1996).

Fase del processo	Aspetti igienico-sanitari	PRPs / GMP applicate per ridurre il rischio	CP/CCP	Limiti Critici / Azioni Correttive
permanenza nelle stalle di sosta	contaminazione tra i gruppi di animali	pulizia e disinfezione	CP	
stordimento	contaminazione con il nastro trasportatore / pavimento	pulizia e disinfezione	CP	
iugulazione	utensili contaminati	<ul style="list-style-type: none"> • pulizia e disinfezione • coltelli a 82°C 	CP	
scottatura	<ol style="list-style-type: none"> 1. accumulo di materiale organico contaminante 2. abbassamento della temperatura sotto i 61°C±1°C 	<ol style="list-style-type: none"> 1. pulizia e disinfezione 2. ritmo di macellazione adeguato 	CP	
depilazione	contaminazione con le macchine (detriti organici)	pulizia e disinfezione	CP	
flambatura	riduzione della contaminazione microbica	controllo di tempo/temperatura e uniformità delle fiamme	CP	
spazzolatura	contaminazione con le macchine (detriti organici)	pulizia e disinfezione	CP	
eviscerazione	<ol style="list-style-type: none"> 1. contaminazione da pacchetto intestinale, lingua, faringe e tonsille 2. contaminazione di utensili ed operatori 3. fuoriuscita di materiale fecale altamente contaminante 	<ol style="list-style-type: none"> 1. formazione del personale; ritmi di macellazione adeguati; buone pratiche igieniche 2. coltelli a 82°C; pulizia e disinfezione; buone pratiche igieniche 	<ol style="list-style-type: none"> 1. CP 2. CP 3. CCP 	3. contaminazione fecale visibile / asportazione totale della parte senza indebito ritardo
divisione delle mezzene	contaminazione della sega	pulizia e disinfezione; temperatura coltelli	CP	
ispezione post-mortem	<ol style="list-style-type: none"> 1. contaminazione a seguito dell'ispezione 2. malattie trasmissibili all'Uomo 	<ol style="list-style-type: none"> 1. pulizia e disinfezione degli utensili 	<ol style="list-style-type: none"> 1. CP 2. CCP 	3. Segni o lesioni di malattia / esclusione dal consumo umano
raffreddamento – permanenza nelle celle frigorifere	permanenza a temperature favorevoli la crescita microbica		CCP	entrata nelle celle frigorifere entro 3 ore dal termine della macellazione / ulteriori esami per stabilire l'idoneità al consumo

Figura 7: schema esemplificativo per l'individuazione dei fattori di rischio, dei programmi pre-requisito e GMP, dei CCP e dei sistemi di monitoraggio e delle azioni correttive applicabili ad ogni fase della macellazione suina (Borch *et al.*, 1996, modificato).

Durante la permanenza nelle stalle di sosta i batteri patogeni possono diffondersi dagli animali infetti o portatori ai suini non infetti. Pertanto le misure preventive da intraprendere in questa fase sono la divisione dei gruppi di animali con provenienza diversa ed efficaci procedure di pulizia e disinfezione attuate tra un gruppo e l'altro. Tuttavia un notevole aiuto alla riduzione di questo rischio si ha attraverso piani di controllo a livello di allevamento, come dimostrato dall'esempio della Svezia e della Norvegia. Da tenere in considerazione c'è anche il tempo trascorso tra l'ingresso in macellazione e l'ultima somministrazione di alimento agli animali, fattore che influenza la ripienezza dello stomaco e del tubo gastro-enterico. Questo chiaramente potrebbe determinare un rischio maggiore di rottura dell'intestino durante l'eviscerazione (Borch *et al.*, 1996).

Durante lo stordimento e la iugulazione i rischi principali sono legati agli utensili e alle superfici a contatto con gli animali contaminati. Pertanto è necessario sanificare adeguatamente le strutture e gli attrezzi, nelle apposite coltelliere che presentano acqua ad una temperatura di 82°C.

La procedura di scottatura, per ridurre l'entità della contaminazione superficiale, deve avvenire in un tempo non inferiore a 6-8 minuti ad una temperatura dell'acqua di circa 61°C. Dato che l'entità della riduzione dipende dalla giusta combinazione di tempo-temperatura, è necessario che i ritmi di macellazione siano adeguati a garantire la conformità a tali parametri. Inoltre, ritmi troppo elevati porterebbero all'accumulo

inevitabile di materiale organico all'interno delle vasche, con effetto protettivo verso i microrganismi: questa fase quindi, se non gestita adeguatamente, invece di determinare la riduzione delle contaminazioni potrebbe essere fonte di batteri patogeni (Borch *et al.*, 1996).

La fase di rimozione delle setole è da considerarsi a rischio per la fuoriuscita di materiale fecale, dovuta all'effetto di schiacciamento causato dai rulli in cui vengono fatte passare le carcasse. Durante questa operazione la contaminazione può essere sparsa all'intera superficie della carcassa e si possono accumulare detriti, che causano la cross-contaminazione delle carcasse successive. Anche in questo caso pertanto sono basilari le procedure di pulizia e disinfezione per la rimozione completa dei detriti organici (Borch *et al.*, 1996).

La flambatura è uno step in cui si registrano grandi riduzioni di cariche microbiche superficiali, sebbene la sua efficacia sia legata necessariamente al tempo e alla temperatura di esposizione della carcassa. Inoltre per poter essere considerato un CCP necessiterebbe di una standardizzazione del numero di fiamme utilizzate per avere una distribuzione omogenea del calore, di un sistema di monitoraggio efficace e dell'individuazione di limiti critici, tutti elementi da considerare sulla base dei futuri sviluppi tecnologici. Per ora pertanto è possibile solo adeguare il ritmo di macellazione perché possa garantire un trattamento sufficiente (Borch *et al.*, 1996).

La spazzolatura successiva contribuisce alla diffusione dei batteri sopravvissuti alla flambatura e, dato che le macchine sono difficili da pulire e sterilizzare, i batteri potrebbero diventare stabili sulle superfici delle spazzole. Particolare cura va posta quindi nelle operazioni di disinfezione in questa fase (Borch *et al.*, 1996).

L'eviscerazione è un'operazione critica per il possibile passaggio di batteri dagli organi manipolati e la carcassa. L'incisione attorno all'ano può avvenire sia manualmente che meccanicamente, anche se è preferibile la prima per ridurre in rischio di incidere l'intestino. Quando viene estratto l'intestino, c'è il rischio di forare la parete in modo tale da diffondere sulla superficie della carcassa materiale fecale altamente contaminate. Per ridurre questo fenomeno è necessario puntare su una formazione del personale adeguata, che consenta di responsabilizzare ciascun operatore sull'entità dell'influenza che le sue azioni svolgono nel determinare la sicurezza del prodotto alimentare finale. Deve esserci formazione sui comportamenti igienici da adottare, sulle buone pratiche di lavorazione e sulle misure preventive da contrapporre ai fattori di rischio, come l'adeguata sterilizzazione dei coltelli e degli strumenti utilizzati dopo ciascuna operazione. Tuttavia, anche dopo aver implementato tutte queste misure preventive, si potrebbe verificare accidentalmente un versamento di materiale fecale sulla carcassa, fenomeno che non può essere controllato solamente attraverso programmi pre-requisito o GMP. Pertanto è

necessario porre in questa fase un CCP che preveda l'asportazione immediata e ampia delle parti della carcassa interessate (Borch *et al.*, 1996).

La separazione delle mezzene è effettuata con seghe elettriche, che possono venire in contatto con l'area *circum*-anale e con la testa, possibili fonti di contaminazione. Se i macchinari sono mantenuti in buono stato e se la velocità della linea di macellazione non eccede la capacità degli strumenti, riducendo il tempo disponibile per la disinfezione, la fase di separazione non contribuisce in modo significativo alla contaminazione delle carcasse (Borch *et al.*, 1996).

Il Regolamento (CE) n. 854/2004 descrive le procedure di ispezione *post-mortem*, basate su tecniche analitiche organolettiche (vista, palpazione e incisione) per riconoscere le lesioni macroscopiche sulle carcasse, le frattaglie, nonché il sangue. Dove necessario richiede il prelievo di campioni per le analisi di laboratorio (esempio ricerca di residui, *Trichinella* spp.). A seguito della visita ispettiva si possono ottenere informazioni relative al sesso, allo stato di nutrizione, alla presenza di edema locale o generalizzato, all'efficienza del dissanguamento, a tumefazioni o deformità, ad anomalie di colore o odore, all'aspetto delle mucose e delle sierose (pleura, peritoneo), ad altre anomalie localizzate o generalizzate (come la setticemia) e ad evidenziare segni di specifiche patologie (Reg. CE n. 854/2004). Le procedure di ispezione *post-mortem*

rappresentano tuttavia esse stesse un rischio di cross-contaminazione. I batteri patogeni possono essere trasportati dalle aree ispezionate alle altre parti della carcassa attraverso i coltelli e le mani degli addetti all'ispezione. Soprattutto l'incisione dei linfonodi, come la rimozione delle tonsille, sono operazioni molto a rischio essendo materiali spesso contaminati. Per questo motivo le operazioni effettuate sulla testa è opportuno che siano svolte su un apposito tavolo, in un locale separato dedicato. Quest'area deve essere considerata sporca e i coltelli e le attrezzature impiegate non devono essere usate per altre parti della carcassa. Inoltre l'accesso del personale in questa area deve essere ristretto. Durante l'ispezione i coltelli, e gli altri strumenti è probabile che diventino contaminati, soprattutto se vengono in contatto con la cavità orale, il retto e gli intestini: i batteri patogeni vengono trasferiti susseguentemente sulla carcassa. Questo fenomeno può essere contenuto attraverso un'adeguata sanificazione tra una carcassa e l'altra. Una procedura adeguata è rappresentata per tale fine dal metodo "2-coltelli", che consente di utilizzare un coltello e nel contempo di decontaminare l'altro nelle apposite coltelliere, che utilizzano l'acqua a 82°C. Chiaramente, se a seguito della visita *post-mortem* si dovessero evidenziare delle lesioni riconducibili a stati patologici che potrebbero influenzare negativamente la salute umana, le carcasse associate devono essere escluse dal consumo umano.

L'EFSA ha emanato un parere scientifico nel 2011 (EFSA, 2011) per quanto riguarda appunto l'ispezione delle carni nell'ambito della macellazione suina. Secondo la valutazione del rischio formulata dal panel sui pericoli biologici, sono stati identificati, come rischi biologici più rilevanti, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Toxoplasma gondii* e *Trichinella* spp. L'identificazione di questi come i patogeni alimentari più rilevanti è stata basata sui dati di prevalenza sulle carcasse refrigerate e sulla gravità della malattia nell'uomo. Tra questi pericoli, *Salmonella* spp. è quello in assoluto più rilevante, mentre gli altri sono contraddistinti da una significatività media. Allo stesso tempo una serie di altri patogeni sono stati inizialmente considerati per poi essere tralasciati, essendo stati giudicati a bassa rilevanza (EFSA 2011). Questo è il caso di *L. monocytogenes*, giudicata come appartenente ad una categoria di rischio intermedia vista l'elevata mortalità per l'uomo, ma la bassa incidenza sulla popolazione. Inoltre è stata definitivamente considerata a basso rischio, per la sua frequente associazione con i prodotti "ready-to-eat" (anche di origine suina), dove la crescita è stata possibile e la contaminazione ha avuto origine dagli ambienti di lavorazione piuttosto che dall'animale stesso (EFSA 2011).

Tuttavia non bisogna dimenticare che le misure preventive applicabili per *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* dovrebbero essere utili per

controllare contemporaneamente molti altri pericoli microbiologici classificati come scarsamente rilevanti.

Allo stesso tempo, il documento mette in luce i punti di forza e debolezze delle attuali procedure ispettive al macello, attualmente basate sulla visita *ante-mortem* (che comprende anche la valutazione delle informazioni legate alla catena alimentare) e l'ispezione *post-mortem* delle carcasse e degli organi. La visita *ante-mortem* ha il vantaggio di poter tenere in considerazione le informazioni che accompagnano gli animali al macello per poter improntare una procedura ispettiva basata su di una valutazione del rischio (EFSA 2011). È importante anche per rilevare le patologie zoonotiche clinicamente visibili, per valutare lo stato di pulizia degli animali e per controllare la loro corretta identificazione, il che consente di avere la tracciabilità ininterrotta lungo tutta la catena alimentare. Tuttavia attualmente l'elevato numero di maiali che vengono avviati alla macellazione non consente di affrontare una visita clinica adeguata dei singoli animali e le informazioni di accompagnamento disponibili non vengono utilizzate ancora come indicatori per la classificazione degli animali in base al rischio per la salute pubblica. La visita *post-mortem* è fondamentale per riscontrare le lesioni macroscopiche causate da determinati agenti zoonotici (micobatteri, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Tenia solium*, *Brucella* spp.), per riscontrare contaminazioni fecali e per eseguire i prelievi per i test di laboratorio (*Trichinella* spp.) (EFSA, 2011).

Molti di questi pericoli sono ora da considerarsi rari e pongono una minaccia soprattutto dal punto di vista professionale, piuttosto che costituire un pericolo ad origine alimentare, secondo la valutazione del rischio da parte dell'EFSA. Le classiche malattie a carattere zoonotico, come la tubercolosi, la trichinellosi, la brucellosi e la cisticercosi, che sono individuabili grazie all'ispezione *post-mortem*, sono ormai controllate in molte aree dove i moderni sistemi di allevamento, di profilassi delle malattie e di salute animale sono stati introdotti efficacemente. Per questo motivo il vantaggio dell'ispezione nel riuscire a riscontrare le lesioni macroscopiche riconducibili a questi agenti eziologici, è rilevante solo per le zone in cui sono ancora presenti. Ad esempio le infestazioni parassitarie da cestodi, relativamente facili da individuare, non pongono un rischio importante correntemente per la salute umana in molti Stati Membri (EFSA 2011).

Tra i limiti maggiori delle procedure ispettive attuali, come sottolineato sempre nel documento dell'EFSA, c'è il fatto che non sono in grado di evidenziare dal punto di vista macroscopico i pericoli zoonotici batterici e parassitari maggiormente rilevanti, che causano uno stato di portatore asintomatico nell'animale. Allo stesso tempo la manipolazione, che è necessaria per mettere in atto le tecniche di palpazione ed incisione richieste durante la visita *post-mortem*, potrebbe rappresentare un rischio di cross-contaminazione batterica, maggiore probabilmente dei rischi per i

quali viene eseguita. L'igiene, che è un pre-requisito per la produzione di carne sicura, è influenzata negativamente dalle procedure di ispezione manuali. Incidere ulteriormente tessuti o organi susseguentemente il sezionamento dei linfonodi, anche di aspetto normale, è una possibile via di diffusione di patogeni come *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* sulla carcassa ed eventualmente tra carcasse differenti. Di conseguenza, secondo questa interpretazione, l'incisione dei linfonodi per individuare lesioni tubercolotiche avrebbe un effetto sfavorevole per la sicurezza microbiologica totale della carcassa e potrebbe essere più rilevante ai fini della tutela della salute pubblica rispetto al rilievo di ascessi causati da microrganismi appartenenti al genere *Micobacterium* (EFSA, 2011).

Il documento dell'EFSA porta, a supporto della sua tesi, numerosi dati desunti dalla letteratura scientifica, che sottolineano come il tralasciare l'incisione non abbassi significativamente la sensibilità e la specificità dell'osservazione visiva (Hamilton *et al.*, 2002; Mousing *et al.*, 1997). Questo anche alla luce del fatto che c'è una forte correlazione tra la prevalenza degli animali portatori di *Salmonella* spp. e il numero di carcasse contaminate alla fine della catena di macellazione. Le carcasse degli animali che albergano il microrganismo (nelle feci o nelle tonsille) sono 3-4 volte più esposte al rischio di presentare *Salmonella* spp., rispetto agli animali non infetti. La presenza di *Salmonella* spp. sulla carcassa infatti si stima possa essere dovuta per il 70% allo stato di portatore dello

stesso animale (auto-contaminazione) e per il restante 30% ad episodi di cross-contaminazione da personale, utensili o ambienti di lavorazione (Berends *et al.*, 1997). Molti agenti microbici associati con le condizioni patologiche più frequenti riscontrate all'ispezione, come ascessi e polmoniti, sono rappresentati da agenti non zoonotici o zoonotici, che tuttavia coinvolgono maggiormente gli operatori. Non è ben chiarito se le specie batteriche isolate dalle anomalie anatomico-patologiche riscontrate dall'ispezione nei suini sostengano un rischio reale per il consumatore (EFSA 2011). Per esempio l'*Arcanobacterium pyogenes*, isolato da ascessi, polmonite, osteomielite, endocardite e infiammazioni cutanee, è raramente causa di infezione nell'uomo e la maggior parte di queste sono il risultato di un'esposizione occupazionale. Secondo questa ottica, *A. pyogenes* dovrebbe essere considerato un rischio insignificante per la salute pubblica attraverso la via alimentare. Tuttavia il riscontro di ascessi è una delle ragioni per dichiarare la carne non idonea al consumo umano, anche se per problemi di qualità e di tipo sensoriale. Allo stesso modo le specie appartenenti ai generi *Streptococcus* e *Erysipelothrix* costituiscono una minaccia più per il personale del macello che per il consumatore (EFSA 2011). In definitiva il giudizio di idoneità della carne al consumo umano non differenzia attualmente gli aspetti di sicurezza alimentare, associati al rischio di diffusione di patogeni o agenti chimici lungo la catena

alimentare, dagli aspetti qualitativi e la prevenzione delle patologie animali dai pericoli occupazionali (EFSA 2011).

Sulla base di queste indicazioni viene proposto dall'EFSA il seguente schema per l'esecuzione della visita ispettiva *post-mortem*:

- In linea generale la palpazione e l'incisione dovrebbero essere omesse dalle visite routinarie dei suini che non hanno manifestato anomalie durante la visita ispettiva *ante-mortem*. La ragione principale è la prevenzione della cross-contaminazione da *Salmonella* spp. causata da queste metodiche invasive. Tuttavia le procedure ispettive tradizionali devono essere mantenute per i soggetti sospetti alla visita *ante-mortem*, per quei casi in cui si dovesse evidenziare una patologia o una condizione che potrebbe influenzare negativamente la salute umana o animale. Per questo motivo detti soggetti dovrebbero essere macellati separatamente e dovrebbero essere effettuati i campionamenti necessari per analisi di laboratorio. L'incisione e la palpazione comunque dovrebbero avvenire separatamente dalla linea di macellazione con strumenti dedicati per prevenire la contaminazione di altre carcasse o organi (EFSA, 2011).
- **Ispezione della testa:** sebbene l'attuale legislazione europea preveda l'incisione dei linfonodi mandibolari per l'individuazione di necrosi caseosa (infezione da micobatteri), le lesioni sono riscontrate

raramente nel suino e in questi casi si tratta spesso di microrganismi diversi, che non rappresentano un pericolo trasmissibile con la carne. Quando sono presenti micobatteri, generalmente è implicato il *M. avium* rispetto al *M. bovis*, rinvenibile solo molto raramente nel suino. Il *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (MAA) e il *Mycobacterium avium* subsp. *hominisuis* (MAH) fanno parte del complesso *Mycobacterium avium* – intracellulare (MAC). Questi batteri sono ubiquitari nell'ambiente e possono essere isolati dall'acqua potabile, dal terreno, dalle piante e persino dalla polvere. Gli uomini possono infettarsi attraverso la via gastrointestinale o bronchiale; i giovani e gli anziani sono maggiormente vulnerabili. Tuttavia non è provata la via di infezione umana attraverso il consumo di carne di maiale, dato che l'infezione origina dal consumo di altri prodotti (latte) o dall'ambiente, e tramite il contatto diretto o inalazione di materiale contaminato. Per queste ragioni, la mancata incisione dei linfonodi mandibolari nei suini durante la macellazione teoricamente potrebbe far aumentare solo in lieve misura il rischio di infezione umana da *Mycobacterium* spp., che rimarrebbe comunque in una categoria di bassa rilevanza, mentre si diminuirebbe in maniera rilevante il rischio di cross-contaminazione da *Salmonella* spp. (EFSA, 2011).

- **Ispezione di polmoni e trachea:** attualmente i polmoni sono palpati e incisi, se diretti al consumo umano, per scoprire stati patologici, legati soprattutto alla presenza di polmonite e broncopolmonite, e raramente di cisti idatidee (da *Echinococcus* spp.). Contemporaneamente la trachea e le ramificazioni principali sono incise per la ricerca di parassiti (*Metastrongylus* spp.) e per verificare la presenza di acqua di scottatura. Bisogna considerare che le patologie polmonari nel suino sono causate da microrganismi che non sono trasmissibili attraverso il consumo di carne (*P. multocida*, *Echinococcus* spp.) o che non sono agenti zoonotici (*Metastrongylus*). Tutte queste situazioni sono da ritenersi rilevanti per il benessere e la salute animale. Pertanto la mancata incisione non aumenterebbe il rischio legato a questi pericoli, anche se, qualora si dovessero evidenziare stati patologici visibili, questi organi dovrebbero essere esclusi dal consumo umano. Anche in questo caso si potrebbe ridurre l'incidenza della contaminazione da batteri a trasmissione alimentare, citati precedentemente (EFSA, 2011).
- **Ispezione del cuore:** il cuore viene inciso nella sua lunghezza coinvolgendo anche il setto interventricolare, per la possibile presenza di endocarditi o pericarditi. L'endocardite acuta è un indice di setticemia in atto, dovuta alla diffusione di microrganismi da altri

organi o tessuti attraverso la circolazione sanguigna. Tuttavia la setticemia, essendo una forma patologica acuta, si dovrebbe rendere manifesta in sede di visita clinica *ante-mortem*. Inoltre i microrganismi che possono sostenere queste forme non sono molto spesso trasmissibili attraverso il consumo di carne (solo lo Streptococco e l'*Erysipelothrix* possono causare infezioni da contatto). D'altra parte i cisticerchi di *Tenia solium* sono trasmissibili all'uomo e sono riscontrabili nel tessuto cardiaco e questo potrebbe rappresentare un rischio per la sicurezza del consumatore. Tuttavia questo parassita è ritenuto non frequente nell'Unione Europea, costituendo un rischio scarso legato al consumo di carne suina. Inoltre, qualora fossero presenti cisticerchi, questi potrebbero essere inattivati dai trattamenti effettuati sulle carcasse per la prevenzione del rischio trichinellosi. Anche in questo caso l'incisione non si renderebbe necessaria in situazioni di macellazione normale (EFSA, 2011).

- **Ispezione del fegato:** il fegato è soggetto a palpazione ed eventualmente ad incisione, inclusi i linfonodi portali, con lo scopo primario di vedere lesioni parassitarie, cisti idatidee (*Echinococcus* spp.) e “milk spot” (*Ascaris suum*), ascessi ed epatiti. Le cisti idatidee, i “milk spot” e gli ascessi sono spesso facilmente visibili sulla superficie dell'organo. Anche le epatiti, che sono secondarie a

lesioni in altri distretti dell'organismo, possono essere individuate visivamente, attraverso alterazioni macroscopiche delle dimensioni e del colore del fegato. Anche in questo caso l'incisione non si renderebbe necessaria in situazioni di macellazione normale (EFSA, 2011).

- **Ispezione del tratto gastro-intestinale:** include la palpazione dei linfonodi mesenterici ed eventualmente la loro incisione, per l'individuazione di necrosi caseosa causata da micobatteri. A riguardo valgono le stesse considerazioni fatte per l'ispezione della testa (EFSA, 2011).

L'ultimo step è rappresentato dal raffreddamento delle carcasse. Sebbene la permanenza dei microrganismi a temperature di refrigerazione non possa essere considerata un metodo di riduzione delle cariche microbiche, tuttavia un'adeguata temperatura di conservazione aiuta nel contenere la crescita dei microrganismi patogeni. La refrigerazione è considerata per questo motivo un CCP (Bolton *et al.*, 2002). L'aumento del numero di batteri sulla carcassa può essere predetto utilizzando modelli matematici, che tengono in considerazione parametri come la temperatura e il pH. La fase di latenza di *Salmonella* spp., a condizioni ambientali di 30°C e pH 7, corrisponde a 3 ore. Pertanto questo elemento deve essere tenuto in considerazione nella fissazione di limiti di tempo critici affinché

la carcassa sia adeguatamente refrigerata. Sebbene le procedure di raffreddamento possano variare da un impianto all'altro, generalmente viene effettuato un raffreddamento rapido a temperature comprese tra -30°C e -10°C per 1-1,5 ore, seguito da uno stoccaggio in celle frigorifere per il raggiungimento di una temperatura inferiore a 4°C. Rispettando questi tempi e queste temperature, questo CCP è da ritenersi sotto controllo (Borch *et al.*, 1996).

Le analisi di laboratorio sono elementi utili sia nella fase preliminare di studio del sistema HACCP per l'individuazione dei punti critici, come si è visto finora, ma anche nella fase operativa, dove rivestono un ruolo di verifica della corretta applicazione e dell'efficacia dell'autocontrollo. Inoltre sono un indice importante per valutare la contaminazione delle materie prime, in questo caso gli animali vivi, e delle superfici a contatto con gli alimenti. Le analisi microbiologiche trovano quindi applicazione nella valutazione della corretta concezione ed attuazione delle procedure e possono indirizzare l'azienda nella selezione dei propri fornitori, con riferimento all'apposita procedura di selezione adottata tra i programmi pre-requisito. La tipologia di analisi da condurre deve essere rapportata alla specifica caratteristica del prodotto. Parametri idonei ai fini della valutazione della carne fresca possono essere indici di scarsa qualità igienica, come enterobatteri e conta mesofila o psicofila totale, o patogeni

potenziali (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*).

L'azienda è tenuta a pianificare annualmente la frequenza delle analisi e i parametri previsti per la specifica tipologia di prodotto, tenendo conto degli obblighi di legge, dei quantitativi di produzione e degli esiti delle analisi precedenti (Determinazione Nazionale 13/01/2005).

I Parametri Microbiologici

I parametri microbiologici sono proposti dall'EFSA come indicatori epidemiologici per i pericoli biologici ad origine alimentare rilevanti per la salute pubblica, che sono legati ai suini e alla carne di maiale (EFSA, 2011a). Tra i pericoli inclusi tra gli indicatori epidemiologici si trova *Salmonella* spp., intendendo come indicatore epidemiologico la prevalenza o l'incidenza di un pericolo ad una specifica fase della catena alimentare o una misura indiretta dello stesso pericolo. È auspicabile che questi indicatori vengano adottati dagli operatori del settore delle carni e dalle autorità competenti, in accordo con la Direttiva (EC) n. 99/2003 “sul controllo delle zoonosi e dei relativi agenti zoonotici”. Sulla base di questa Direttiva (recepita con il Decreto Legislativo n. 191/2006) sia la salmonellosi che la listeriosi, inserite nella lista A dell'Allegato I, sono da sottoporre a sorveglianza indipendentemente dalla situazione epidemiologica del Paese Membro, nella fase o nelle fasi della catena alimentare più idonee.

Gli indicatori possono essere usati da soli o in combinazione tra loro e dovrebbero servire per valutare l'efficacia delle misure intraprese negli stabilimenti di macellazione per controllare specifici pericoli, oltre che per classificare i Paesi, le regioni o gli allevamenti in relazione allo *status* di prevalenza delle infezioni (EFSA,2011a).

È importante sottolineare che i microrganismi cosiddetti “indicatori” sono maggiormente indicati rispetto ai batteri patogeni per la valutazione

dell'igiene del processo, dato che i patogeni si riscontrano meno frequentemente nell'animale o sulle carcasse. La ricerca dei batteri patogeni è da preferire, invece, nei casi di valutazione dell'esposizione del consumatore e all'interno dei programmi di controllo o eradicazione (EFSA, 2011).

Salmonella spp.

Salmonella spp. è da lungo tempo riconosciuta un importante patogeno per l'uomo e gli animali, essendo un microrganismo a carattere zoonotico di grande rilevanza economica. Il suo ruolo come causa di zoonosi è stato documentato per la prima volta negli ultimi anni del 1800 dal patologo veterinario D. E. Salmon. Lignières nel 1900 attribuì il nome dello scienziato al genere *Salmonella*. Attualmente il genere *Salmonella* è inquadrato nella famiglia delle Enterobacteriaceae e comprende microrganismi anaerobi facoltativi, ossidasi negativi e catalasi positivi. Risultano negativi alla colorazione di Gram di forma bacillare e di grandezza pari a 0,7-1,5x5µm, sebbene possano formare lunghi filamenti. La maggior parte dei ceppi sono mobili (ad eccezione di *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*) per la presenza di flagelli peritrichi e fermentano tutti il glucosio, con produzione di acido e di gas (Cox, 1999).

La classificazione tassonomica

Il genere è attualmente suddiviso in 2 specie: *S. enterica* e *S. bongori*. La specie *S. enterica* è ulteriormente suddivisa in 6 sotto-specie, sulla base delle diverse caratteristiche biochimiche e di alcuni esperimenti di ibridazione del DNA genomico: queste sei sottospecie sono *S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtenae*, *S. indica*. In realtà solo

i batteri appartenenti a *S. enterica* subsp. *enterica* sono in grado di colonizzare l'intestino dell'uomo e degli animali a sangue caldo e pertanto la maggior parte dei sierotipi rilevanti per la salute pubblica appartengono a *S. enterica* subsp. *enterica* (Ricci, 2005). I sierotipi appartenenti a questa sottospecie sono stati denominati in base al luogo di primo isolamento o alla patologia che sostengono nell'uomo o negli animali. Attualmente sono conosciuti più di 2500 sierotipi differenti, che vengono generalmente indicati dal nome della specie (*Salmonella enterica*) seguito dal nome maiuscolo del sierotipo (es. *S. enterica* sierotipo Typhimurium). Frequentemente la denominazione della sierovariante è abbreviata (come ad esempio per *Salmonella* Typhimurium o *S. Typhimurium*) (Cox, 1999).

I sierotipi sono determinati in base allo schema antigenico proposto da Kauffmann-White, basato sulle differenze di reazione con anticorpi diretti verso due tipi di antigeni di superficie maggiori e, in certi casi, antigeni minori. La divisione in sierogruppi è basata su differenze di epitopi del lipopolisaccaride (LPS), un componente maggiore della membrana esterna dei batteri Gram negativi. L'LPS, denominato antigene O (o somatico), è composto da tre parti: il lipide A, un nucleo polisaccaridico e una catena laterale oligosaccaridica, che conferisce la specificità al gruppo. Le catene laterali sono composte da unità ripetute di oligosaccaridi, che includono un ampio spettro di zuccheri, tra cui rari eptosi. I ceppi che sono deficitari della catena laterale dell'antigene O sono

noti produrre colonie rugose sui terreni di coltura e non in grado di agglutinare con gli omologhi antisieri. Ciascun sierogruppo è determinato da un particolare antigene O e ciascuno di questi è indicato con un numero arabo compreso tra 1 a 67, anche se in modo non sequenziale. Talvolta certi antigeni codificati a livello cromosomiale possono non essere espressi o prodotti a livelli non individuabili. Tali antigeni, come l'O5 nel sierotipo *S. Typhimurium*, sono indicati nella formula antigenica tra parentesi quadre (Cox, 1999).

All'interno dei sierogruppi, i ceppi sono ulteriormente differenziati in sierotipi sulla base degli antigeni flagellari H. I sierotipi possono disporre di 1, 2 o 3 fasi di antigeni flagellari (vengono definiti pertanto monofasici, difasici o trifasici, rispettivamente), anche se nella maggior parte dei casi ne posseggono due. Gli antigeni di fase 1 sono indicati nella formula antigenica con lettere minuscole e, oltre al ventiseiesimo, dalla lettera z seguita da numeri progressivi. Gli antigeni H di fase 2 invece sono indicati con numeri arabi (Cox, 1999). Gli antigeni H costituiscono un gruppo di circa 35 antigeni di natura proteica, che vengono distrutti dal calore. La fase 1 è definita specifica, in quanto è tipica di un determinato sierotipo, mentre la fase 2 è comune a più sierotipi (Ricci, 2005). In alcuni ceppi di *Salmonella* spp. si trova anche un terzo tipo di antigene, chiamato Vi (antigene di virulenza), fattore presente in *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *S. Dublin* e *S. Typhimurium*. Questo elemento è composto da polisaccaridi acidi,

localizzati sulla superficie delle cellule batteriche. L'antigene Vi ha la caratteristica di mascherare gli antigeni O e di impedire un sufficiente avvicinamento dei corpi batterici, rendendoli non agglutinabili dai sieri somatici. Si può dire che l'antigene Vi di *Salmonella* corrisponda agli antigeni K (capsulari) degli altri enterobatteri. Infine vi sono gli antigeni F, un tempo classificati tra gli antigeni K. Questi sono tipici delle fimbrie o pili, che si irradiano dalla superficie cellulare. Le fimbrie sono strutture di natura proteica e sono più corte e sottili dei flagelli. Sono considerate fattori di patogenicità, meglio note come adesine, in quanto presentano estremità idrofobiche, che aderiscono alle cellule o a substrati diversi (Ricci, 2005).

I ceppi, infine, possono essere ulteriormente classificati con altri metodi fenotipici e genotipici, che includono la bio-tipizzazione, la tipizzazione fagica, il pattern di resistenza agli antimicrobici, l'analisi delle endonucleasi di restrizione, la gel elettroforesi in campo pulsato e il profilo plasmidico (Cox, 1999).

Le caratteristiche biochimiche

L'identificazione biochimica del genere *Salmonella* prevede i seguenti risultati alle specifiche reazioni: mancata idrolisi dell'urea; mancata produzione di acetoina; mancata fermentazione di lattosio (caratteristica discriminante rispetto ai microrganismi coliformi), adonitolo,

saccarosio, salicina; produzione di idrogeno solforato (H₂S) a partire dal tiosolfato; decarbossilazione di lisina e ornitina; crescita su terreno citrato di Simmons; idrolisi di 4-metillumbelliferil caprilato (MUCAP). Tuttavia alcuni sierotipi mostrano comportamenti devianti: ad esempio *S. Typhi* non è in grado di decarbossilare l'ornitina e non cresce sul terreno di Simmons, mentre le sottospecie diverse da *S. enterica* subsp. *enterica* possono fermentare il lattosio.

Alcune caratteristiche fenotipiche peculiari vengono sfruttate per le metodiche analitiche colturali di isolamento del microrganismo, per esempio durante le fasi di arricchimento selettivo o per l'allestimento dei terreni selettivo – differenziali. Il brodo di arricchimento Rappaport Vassiliadis e il terreno agarizzato Brilliant Green Agar, ad esempio, contengono il verde malachite e il verde brillante rispettivamente, verso i quali le salmonelle sono più resistenti rispetto agli altri generi della famiglia delle Enterobacteriaceae. Inoltre molti terreni colturali selettivi utilizzati per l'isolamento presentano caratteristiche differenziali, quali la presenza di lattosio e saccarosio, che le salmonelle non sono in grado di utilizzare (Ricci, 2005).

Le caratteristiche colturali

Un ampio range di condizioni ambientali influiscono sulla crescita, la morte o la sopravvivenza di *Salmonella* spp., e tali misure sono alla base dei sistemi di controllo nell'industria alimentare.

La temperatura di crescita di *Salmonella* spp. è compresa nel range di 2-54°C, sebbene la crescita sotto i 7°C avvenga esclusivamente sui terreni colturali e sopra i 48°C sia prerogativa dei ceppi termofili. La temperatura ottimale per la crescita è 37°C, che riflette la natura mesofila del microorganismo, che vede come habitat naturale il tratto gastro-intestinale degli animali. Oltre la temperatura massima, *Salmonella* viene inattivata molto velocemente, essendo altamente termosensibile e quindi labile anche ai processi termici più blandi, come la pastorizzazione. Tuttavia è osservata una certa variabilità di sensibilità tra i vari ceppi, con valori D medi pari a 1,3 e 0,4-0,6 per temperature di 57°C e 60°C, con valori z di 4-5°C. *Salmonella* Senftenberg è il sierotipo maggiormente resistente al calore. L'esposizione a condizioni avverse, incluse temperature sub-letali e valori di pH estremi, aumenta la resistenza alla temperatura. Gli alimenti solidi, ricchi in modo particolare di proteine e grassi, e con attività dell'acqua (A_w) bassa sono altamente protettivi. Ad esempio il tempo di sopravvivenza in cioccolato o arachidi viene misurato in ore, anziché in minuti. La termoresistenza è aumentata in misura inferiore quando soluti, come l'NaCl, sono utilizzati per ridurre l' A_w piuttosto che gli zuccheri. D'altra

parte *Salmonella* resiste bene alle basse temperature, anche se si nota una certa variabilità in base alla matrice e a fattori quali il pH e l' A_w . I microrganismi quindi possono sopravvivere per giorni o settimane a temperatura di refrigerazione (Cox, 1999).

Il pH ottimale per la crescita di *Salmonella* spp. è compreso nel range di 6,5-7,5 unità, anche se la crescita è possibile in maniera variabile anche fino a 4,05 e 9,5. In questo senso notevole influenza esercita il tipo di acidificante utilizzato. Mentre la crescita può avvenire fino al limite minimo in presenza di acidi organici non volatili, come l'acido citrico, o acidi minerali, come l'acido cloridrico, la moltiplicazione si arresta a valori di pH pari a 5,4 quando sono impiegati acidi organici volatili, come l'acido acetico. L'effetto inibitorio di questi ultimi è inversamente proporzionale alla lunghezza della catena e aumenta in condizioni di anaerobiosi, presumibilmente per il fatto che si riducono le concentrazioni di energia disponibile (ATP): questo fatto si ripercuote in una diminuzione delle capacità del microrganismo di rimuovere gli acidi dall'ambiente intracellulare. La temperatura aumenta la sensibilità ai bassi valori di pH, come pure la presenza di additivi conservanti, quali il sale o i nitriti. L'adattamento a bassi valori di pH ha un importante significato epidemiologico (aumento di virulenza), dato che incrementa le possibilità di sopravvivenza all'acidità gastrica o nell'ambiente intracellulare delle cellule fagocitarie (Cox, 1999).

Salmonella spp. cresce a valori di attività dell'acqua compresi tra 0,999 e 0,945 sui terreni di crescita e fino a 0,93 negli alimenti, mentre l'*optimum* si colloca a 0,995. Sebbene non ci sia crescita al di sotto di 0,93, tuttavia il microrganismo sopravvive e la durata è direttamente proporzionale all'Aw. Il sale (NaCl), impiegato per diminuire l'acqua libera, è inibitorio a concentrazioni di 3-4%, ma la tolleranza aumenta a temperature comprese tra 10 e 30°C (Cox, 1999).

I fattori di virulenza

Salmonella spp. è dotata di vari fattori di virulenza, che sono il Lipopolisaccaride, la Fimbrie, le Tossine, i Siderofori, altri fattori codificati a livello cromosomiale, nonché i Plasmidi.

Il lipopolisaccaride, grazie alla presenza della catena laterale, impedisce stericamente il legame con i componenti del sistema a cascata del complemento, prevenendo in questo modo la lisi cellulare. Questa proprietà è attribuita alla lunghezza della catena e al grado di glicosilazione (Cox, 1999).

Le fimbrie hanno la funzione di legare la fibronectina e quindi di dare avvio alla colonizzazione intestinale (Cox, 1999).

Le tossine prodotte da *Salmonella* comprendono enterotossine, responsabili dei sintomi diarroici. La tossina di *Salmonella*, che mostra analogie con quella del colera, è composta da 2 sub-unità A e B: la prima stimola

l'adenilato ciclasi della cellula ospite (enterocita) mentre la seconda crea un poro nella membrana cellulare per il passaggio della tossina stessa. I livelli intracellulari notevolmente aumentati di AMP ciclico portano ad un aumento massivo delle concentrazioni di ioni cloro e sodio nell'ambiente extracellulare, con conseguente accumulo di fluidi nel lume intestinale. *Salmonella* spp. produce anche una citotossina legata alla membrana. Questa viene rilasciata nell'ambiente intracellulare, come conseguenza di una modesta distruzione batterica, e inibisce la sintesi proteica, portando alla lisi della cellula ospite e in ultima analisi alla disseminazione del batterio (Cox, 1999).

I siderofori sono fattori importanti per l'acquisizione di ioni ferro, elemento critico per la crescita batterica. Come molti altri membri delle Enterobacteriaceae, *Salmonella* spp. produce due tipi di molecole che sequestrano il ferro. La prima è nota come enterobactina o enterochelina e la seconda come aerobactina. Queste legano il ferro presente nel siero o nel lume intestinale e dopo il legame con una proteina di membrana, lo traslocano nel citoplasma, dove lo ione ferroso è ridotto a ione ferrico. I ceppi che sono dotati di enterobactina sono generalmente più virulenti di quelli che producono aerobactina (Cox, 1999).

Una serie di fattori di virulenza aggiuntivi sono codificati a livello cromosomico in molti *loci*, che comprendono un numero elevato di geni, noti come isole di patogenicità. In una di queste è presente la regione *inv*,

necessaria per determinare la capacità invasiva del microrganismo. Questi geni sono espressi in condizioni tipiche dell'ambiente intestinale. Altre regioni del cromosoma batterico codificano per fattori di sopravvivenza intracellulare, contro i radicali liberi dell'ossigeno prodotti dai macrofagi e dalle altre cellule fagocitarie (Cox, 1999).

I plasmidi contengono materiale genetico extra-cromosomiale (la cosiddetta regione *spv*), che contribuisce ad aumentare la virulenza. La regione include almeno cinque geni, *spvRABCD*, che concorrono ad aumentare il tasso di moltiplicazione intracellulare e a favorire la disseminazione sistemica. Contrariamente alle aspettative, i sierotipi ospite-specifici più virulenti per l'uomo, come *S. Typhi*, non sono dotati di questi plasmidi di virulenza e si ipotizza che i geni siano pertanto integrati direttamente a livello del cromosoma batterico (Cox, 1999).

L'epidemiologia del microrganismo

L'infezione ha inizio con l'ingestione di una dose di batteri sufficiente a sopravvivere alle difese dell'ospite e a colonizzare il tratto gastro-intestinale. La dose necessaria è influenzata dalla natura e dallo stato fisiologico del ceppo stesso, dalla matrice alimentare e dallo stato fisiologico dell'ospite. I soggetti giovani, anziani o immuno-compromessi sono maggiormente esposti al rischio di infezione, a causa del sistema immunitario meno efficiente e della ridotta acidità gastrica. Allo stesso

modo una matrice alimentare ricca di grassi o di proteine protegge il microrganismo, essendo una barriera verso l'acidità gastrica. Tuttavia, si ritiene che la dose infettante sia compresa nel range di 10^6 - 10^8 UFC, anche se determinati episodi tossinfettivi hanno dimostrato che può essere molto inferiore (Cox, 1999).

Anche se la maggior parte dei casi di salmonellosi nell'uomo è imputabile al consumo di prodotti di origine animale (soprattutto carne avicola e suina, uova), non bisogna dimenticare che l'ubiquitarietà tipica del microrganismo comporta che qualsiasi alimento, qualora non manipolato o conservato correttamente, può essere fonte di infezione. Molti episodi tossinfettivi avvengono come conseguenza del tempo prolungato che intercorre fra la preparazione o cottura dell'alimento ed il consumo, il che rende possibile la moltiplicazione dei batteri presenti (Ricci, 2005).

I principali fattori di rischio, in generale, sono rappresentati dalla cottura insufficiente o dal riscaldamento di pietanze già cotte, dalla conservazione a temperature inadeguate e dalla contaminazione crociata tra alimenti crudi e cibi cotti. Meno importante appare invece il ruolo del personale infetto o portatore, in quanto gli addetti alla lavorazione degli alimenti, seppure escretori di microrganismi, risultano raramente essere fonte di contaminazione, soprattutto qualora adottino comportamenti corretti nella manipolazione degli alimenti. È importante a questo proposito ricordare che le salmonelle vengono rapidamente rimosse attraverso un

accurato lavaggio delle mani. Il ruolo degli operatori invece è estremamente rilevante per quanto riguarda la contaminazione crociata dei cibi. È dimostrato che la scorretta manipolazione delle materie prime contaminate comporta un'estesa contaminazione ambientale che, in conseguenza dell'elevata sopravvivenza ambientale del microrganismo, può essere causa di contaminazione di alimenti pronti all'uso (Ricci, 2005).

La presenza di *Salmonella* spp. nella carne è generalmente conseguente a contaminazione di tipo fecale, direttamente proporzionale all'entità dell'infezione dell'animale e alle carenze igieniche in fase di macellazione. Il rischio aumenta se si considerano le carni macinate o gli insaccati freschi, in quanto la lavorazione di questi prodotti può comportare la penetrazione negli stessi dei microrganismi che abitualmente si trovano a livello superficiale, aumentandone la capacità di adesione e conseguentemente la resistenza al calore (Ricci, 2005).

I batteri appartenenti al genere *Salmonella* hanno come habitat il tratto intestinale dell'uomo e degli animali: quindi la loro presenza nell'acqua, negli alimenti, nell'ambiente in senso lato è giustificabile a seguito di contaminazione fecale. Il serbatoio comune di *Salmonella* è rappresentato da un ampio range di animali domestici e selvatici, sia a sangue caldo che a sangue freddo (Ricci, 2005). Gli animali sono i più importanti serbatoi e disseminatori di salmonelle. I bovini, i suini, gli equini, gli ovini, i conigli, i polli, le oche, i tacchini e le anatre sono gli

animali che più frequentemente sono chiamati in causa. Non è raro, tuttavia, isolare *Salmonella* anche da topi, ratti, cani e gatti, cavie e animali a sangue freddo, come serpenti e tartarughe, che vivono spesso in appartamento (Rondanelli *et al.*; 2005). Alcuni sierotipi sono particolarmente adattati a determinate specie ospiti: *S. Typhi* e *S. Paratyphi* all'uomo; *S. Abortusovis* agli ovini, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* alle specie aviarie. La maggior parte dei sierotipi tuttavia non presenta nessuna specificità d'ospite e questi risultano caratterizzati da cicli epidemiologici estremamente complessi. Sierotipi come *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* sono in grado di colonizzare l'intestino di diverse specie animali, di contaminare l'ambiente, i mangimi e di provocare nell'uomo forme morbose di gravità estremamente variabile. Se è vero che spesso si verifica una circolazione interumana di questi microrganismi, tipicamente a ciclo oro-fecale, è predominante la trasmissione di tipo zoonosico animale-uomo, sia essa diretta o più frequentemente indiretta, attraverso gli alimenti. Pertanto questi sierotipi sono rinvenibili in una grande varietà di alimenti, sia di origine animale che vegetale, che costituiscono un'importante fonte di infezione per l'uomo (Ricci, 2005).

Gli alimenti contaminati da *Salmonella* spp., ma soprattutto la carne, anche quando la carica batterica è elevata, non vengono alterati nelle loro caratteristiche organolettiche, come sapore e odore. La contaminazione spesso avviene quando *Salmonella* è introdotta nelle aree di preparazione

degli alimenti e ci sono le condizioni favorevoli perché il microrganismo si moltiplichi, come ad esempio situazioni di abuso termico ed episodi di cross-contaminazione. *Salmonella* infine può essere trasmessa attraverso il contatto diretto con animali infetti o per via interumana, ma anche l'ambiente contaminato dal punto di vista fecale può rappresentare una fonte importante di infezione. Negli animali le infezioni sub-cliniche sono comuni. Il microrganismo può facilmente diffondersi tra gli animali in un gruppo e questi possono diventare portatori, quindi escretori, intermittenti o persistenti. La febbre e la diarrea legata all'infezione da *Salmonella* sono meno comuni nei suini rispetto ai bovini, pecore e cavalli, mentre capre e pollame generalmente non mostrano segni di infezione (Ricci, 2005).

Le forme di malattia nell'uomo

Salmonella è ritenuta sostenere nell'uomo due diverse forme patologiche: una gastroenterite febbrile e forme sistemiche, anche se è possibile che la malattia possa esordire con la prima forma ed evolversi successivamente nella seconda (Cox, 1999). L'uomo, malato o portatore, è una fonte di contagio, in quanto alberga il microrganismo e lo elimina abbondantemente con le feci e con le urine. Dopo la risoluzione dei sintomi clinici il soggetto può diventare portatore, manifestando persistenza di *Salmonella* nelle feci o nelle urine per periodi superiori anche ad 1 anno. Questo evento si verifica nello 0,2-0,6% dei pazienti con salmonellosi non

tifoidea e nell'1-4% delle infezioni sostenute da *S. Typhi* (Rondanelli *et al.*; 2005).

La febbre tifoide è diffusa in tutto il mondo e in Italia era presente in tutte le zone della penisola, in particolare nelle regioni costiere con recrudescenze nella stagione estivo - autunnale. Il termine Tifo (o febbre tifoide) deriva da un termine greco, che significa obnubilamento e torpore. È una malattia infettiva e contagiosa, endemica-epidemica (Rondanelli *et al.*; 2005). La malattia sistemica è associata a sierotipi ospite-specifici, come *S. Typhi*, *S. Paratyphi* e *S. Sendai*. Questa forma è contraddistinta da un lungo periodo di incubazione, una dose infettante bassa e sintomi a carattere sistemico, con esito talvolta letale. Tuttavia la via di trasmissione di questa forma non segue in maniera preponderante la via alimentare (Cox, 1999). Pertanto la sola ed obbligata sorgente di contagio è praticamente rappresentata dall'uomo, che può eliminare le salmonelle con l'urina e specialmente con le feci. Un altro materiale altamente infettante è il vomito. L'eliminazione delle salmonelle per via urinaria è molto pericolosa perché le quantità di microrganismi sono molto maggiori e perché le mani si possono imbrattare molto facilmente. Le vie di diffusione, per questa forma, infatti vedono un passaggio dal soggetto malato o portatore all'individuo sano attraverso un contatto diretto, mediante manipolazione di sostanze alimentari, attraverso la contaminazione dell'acqua, per mezzo di insetti o animali vettori meccanici. Un altro importante mezzo di diffusione

è costituito dai frutti di mare, dato che molte Salmonelle possono essere rinvenute nei liquami fognari, cosicché è facile la contaminazione di zone balneari o adibite alla coltivazione di molluschi bivalvi. Dal punto di vista biochimico, *S. Typhi* possiede un debole potere proteolitico e non produce indolo, quindi non conferisce odore sgradevole alle sostanze alimentari. Nel latte, inoltre, si sviluppa con facilità senza produrre coagulazione né rilevanti modificazioni dell'aspetto e delle caratteristiche organolettiche. I bacilli vivi resistono a lungo in ambienti umidi al di fuori dell'organismo umano. Nel terreno concimato resistono per mesi, così come nelle acque fognarie; d'altra parte non sono sopraffatti dai batteri della putrefazione. La sopravvivenza dipende in primo luogo dal grado di protezione dalla luce e dall'essiccamento (Rondanelli *et al.*; 2005).

La patogenesi dell'infezione prevede l'ingestione del microrganismo che raggiunge l'intestino dopo aver superato la barriera gastrica. In seguito, si infiltra nelle placche del Peyer e nei follicoli linfatici associati all'intestino, da dove passa ai linfonodi associati al tratto gastro-intestinale. Qui può moltiplicarsi attivamente e passare al torrente circolatorio, attraverso il dotto toracico e le grosse vene tributarie del cuore destro. Arrivato a questo punto può diffondersi a tutto l'organismo con i caratteri di una batteriemia più che una setticemia; anche in questo caso mostra una predilezione per i tessuti linfatici (Rondanelli *et al.*; 2005).

I sintomi clinici si evidenziano una volta che si mettono in atto le lesioni a carico del tratto splancnico e del sistema nervoso autonomo e centrale. Da qui deriva il classico stato stuporoso e l'aumento della temperatura corporea. All'esame esterno non si evidenziano particolari caratteristiche, se non le classiche roseole sulla cute (roseole tifiche). L'addome si presenta gonfio, essendo le anse intestinali meteoriche e fortemente congeste, come d'altra parte i linfonodi, iperplastici ed iperemici. Le lesioni principali sono a carico dell'ultima porzione dell'ileo; il digiuno è colpito molto raramente e rara è la localizzazione al colon. In ogni caso il quadro sintomatologico è estremamente polimorfo (Rondanelli *et al.*; 2005).

Nella forma tipica il tifo ha una classica evoluzione ciclica, che consente di suddividere la patologia in quattro periodi, detti settenari avendo una durata di sette giorni circa ciascuno. Il periodo di incubazione coincide con il tempo necessario al microrganismo di giungere ai linfonodi mesenterici e di moltiplicarsi. Questo periodo decorre assolutamente senza sintomi e può essere riscontrabile solamente uno stato generale di malessere. Il primo settenario coincide con la comparsa della febbre e corrisponde all'entrata nel circolo ematico di *Salmonella Typhi*. L'andamento della curva termica è caratteristico perché la febbre ha un'ascesa graduale di mezzo grado al giorno, con una salita a gradinate: verso il 6-7° giorno la temperatura si attesta sui 39,5-40°C. Si nota

l'assenza di brividi e sudorazione ed incomincia a manifestarsi la disidratazione. Sono molto frequenti i rumori di gorgoglio ileo-ciecale, indice di presenza di liquido misto a gas nell'intestino. Il secondo settenario corrisponde alla necrosi delle placche del Peyer e dei follicoli linfatici del GALT (tessuto linfatico associato all'intestino). Il sensorio è in un profondo stato di disordine, si ha cioè il classico stato stuporoso. Si alternano in particolare intervalli di lucidità a fasi di agitazione psichica. Il soggetto è profondamente astenico e adinamico; a volte si evidenziano movimenti automatici di prensione, ma la muscolatura è flaccida. Sempre in questo periodo si rende evidente la roseola tifica, segno cutaneo patognomonico della malattia. L'eruzione è localizzata sulla faccia anteriore del torace e dell'addome, talvolta sulla regione lombare. Si tratta di piccole chiazze tondeggianti, lievemente sollevate di 2-3 mm di diametro e poco numerose. Nel terzo settenario avviene la caduta dell'escara e la formazione di ulcere intestinali. Nel quarto e ultimo periodo si osserva una progressiva defervescenza, con sudorazione anche abbondante tanto da provocare la formazione di vescichette ripiene di liquido. In questa fase il soggetto riprende il sensorio e si completa la guarigione a livello intestinale. I disturbi a carico del sistema nervoso sono i primi a scomparire, seguiti da quelli dell'apparato digerente. Gli ultimi sintomi a regredire sono quelli a carico del sistema cardio-circolatorio (Rondanelli *et al.*; 2005).

La sindrome gastro-enterica (infezione da *Salmonella* non tifoidea) invece è spesso associata al consumo di alimenti contaminati. La gastroenterite spesso non è distinguibile da altre forme di infezione da altri patogeni alimentari. I sintomi clinici di malattia sono generalmente caratterizzati da forme acute di diarrea, dolori addominali, nausea e talvolta vomito. Il quadro clinico vede inoltre ipertermia, con temperature di 38-39°C, mentre solo più raramente si osservano cefalea e mialgia. Per lo più le feci sono non formate, sfatte, di volume modesto e senza sangue; raramente sono acquose e di volume elevato. L'analisi microscopica delle feci dimostra abbondante presenza di neutrofili e talvolta di globuli rossi. La forma gastro-enterica non tifoidea è caratterizzata infatti nell'uomo da una massiva infiltrazione neutrofila a livello della mucosa dell'intestino tenue e di quello crasso, a differenza della febbre tifoide, che invece è associata ad infiltrazione della mucosa dell'intestino tenue con mononucleati. La degranolazione e il rilascio di sostanze tossiche da parte dei neutrofili possono contribuire al processo infiammatorio e determinare un danno tissutale, la secrezione di fluidi attraverso la mucosa intestinale, a causa dell'alterazione delle "tight junctions" delle cellule epiteliali. Il periodo di incubazione è variabile tra le 12 e 72 ore e i sintomi sono spesso lievi, dato che le infezioni sono generalmente auto-limitanti (i tassi di mortalità sono dello 0,1-0,2%) con una durata variabile di qualche giorno. La diarrea dura in genere da 3 a 7 giorni mentre la febbre si risolve in 48-72 ore. Dopo la

risoluzione dell'episodio gastro-enterico per 4-5 settimane vi può essere persistenza di *Salmonella* nel materiale fecale (Rondanelli *et al.*, 2005).

Tuttavia, in determinati soggetti, l'infezione può essere più seria e lo stato di disidratazione conseguente può mettere a rischio la vita del paziente e richiedere l'ospedalizzazione. In questi casi, come quando *Salmonella* causa infezioni sistemiche, il trattamento antibiotico è essenziale per la guarigione e la remissione dei sintomi (Cox, 1999). La terapia antibiotica prevede l'utilizzo di una dose singola di fluorochinoloni per via orale o in alternativa, amoxicillina o trimethoprim in associazione con sulfametossazolo per via parenterale: il periodo di somministrazione deve essere di 48-72 ore oppure fino al raggiungimento dell'apiressia. Il riscontro di elevate concentrazioni di amoxicillina e di chinoloni nella bile evidenziano una maggior penetrazione a livello intracellulare, facendoli ritenere preferibili rispetto al trimethoprim – sulfametossazolo. La terapia, necessaria nelle forme gravi, tuttavia non sembra diminuire il tempo di manifestazione della sintomatologia, anzi sembra aumentare il rischio di ricaduta. Pertanto si ritiene che solo i pazienti con aumentato rischio di infezione invasiva possono trarre giovamento dalla terapia antibiotica (Rondanelli *et al.*; 2005).

L'infezione da *Salmonella* può causare processi infettivi a localizzazione extraintestinale clinicamente primitivi, come osteomieliti, meningiti ed otiti. *Salmonella* infatti può arrestarsi alla fase intestinale

oppure evolvere fino alla forma diffusa, caratterizzata generalmente da una sintomatologia abbastanza grave in relazione al potere invasivo del microrganismo. Molto spesso nell'adulto il processo tossinfettivo non supera il distretto intestinale, ma negli individui con le difese immunitarie meno efficaci (neonati, anziani, donne in gravidanza, immunodepressi) la forma inizialmente gastroenterica si trasforma in un processo generalizzato. Le infezioni locali si sviluppano nel 5-10% dei pazienti con batteriemia da *Salmonella* e sono particolarmente severe e di difficile trattamento. Le localizzazioni conosciute sono: endocardio (0,2-0,4%) con vegetazione valvolare e trombosi infettiva murale; arterie; sistema nervoso centrale nell'0,1-0,9% dei casi con meningite, ascessi e alterazione dei ventricoli; polmoni con quadri di polmonite; ossa, soprattutto femore, tibia, omero e vertebre lombari nell'1% circa dei casi; articolazioni (0,1-0,2%) soprattutto ginocchio, anca e spalla determinando distruzione articolare e osteomielite; fegato; milza; vescica urinaria e reni; organi genitali; tessuti molli in genere, che si manifestano con dermatiti pustolari, ascessi subcutanei e ferite infette (Rondanelli *et al.*, 2005).

Inoltre, *Salmonella* spp. è associata a sequele a lungo termine o croniche a carattere auto-immunitario, come l'artrite reattiva o sindrome di Reiter. In questi casi l'incorporamento dei LPS batterici nelle cellule delle articolazioni sinoviali causa la proliferazione cronica dei linfociti e la susseguente risposta infiammatoria auto-alimentante (Cox, 1999).

L'epidemiologia delle infezioni a trasmissione alimentare

Nell'Unione Europea *Salmonella* è responsabile di molti casi di malattia umana e in molti Paesi sviluppati è la seconda causa più comune di gastro-enterite batterica, seconda solo alla campilobatteriosi (Figura 8).

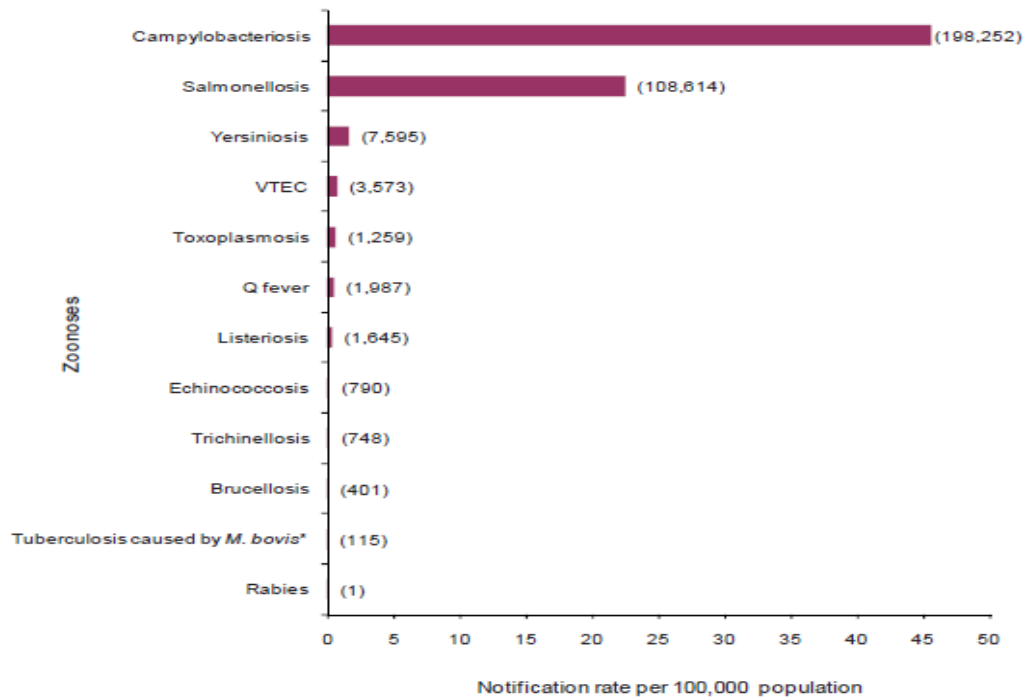


Figura 8: tassi di notifica di zoonosi per casi umani confermati nell'Unione Europea nell'anno 2009; i tassi di notifica sono espressi su 100.000 abitanti (EFSA e ECDC, 2011).

Tuttavia *Salmonella* spp. è l'agente eziologico che causa un numero maggior e di focolai tossinfettivi umani, come mostrato dalla figura 9 (EFSA e ECDC, 2011).

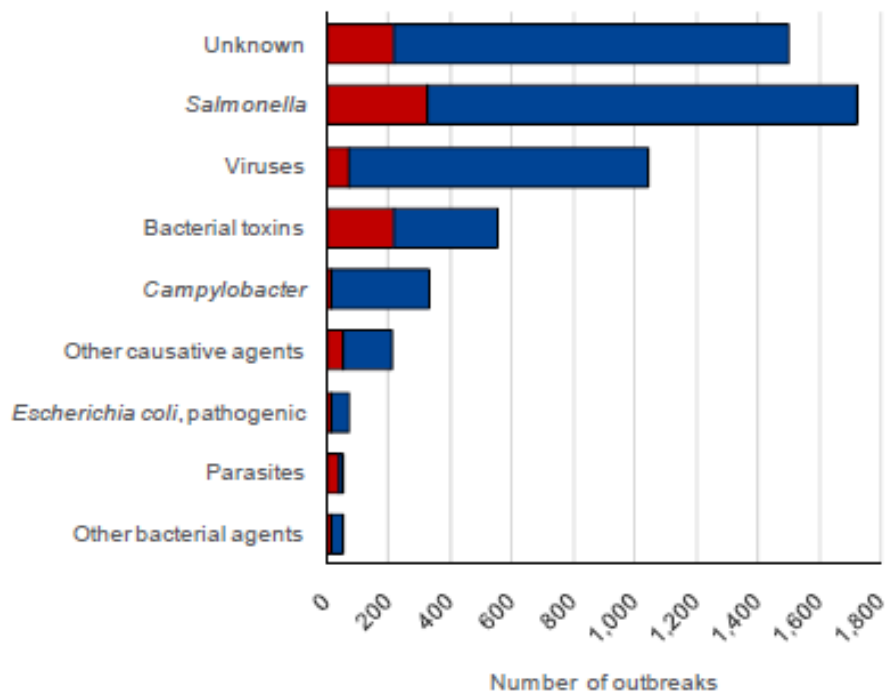


Figura 9: distribuzione dei focolai tossinfettivi ad origine alimentare (possibili e verificati) per agente eziologico nell'Unione Europea nell'anno 2009. I focolai verificati sono mostrati in rosso, quelli possibili in blu (EFSA e ECDC, 2011).

Un totale di 108.614 casi umani confermati di salmonellosi sono stati registrati nell'Unione Europea nel 2009: il numero di casi è diminuito del 17,4% rispetto al 2008, continuando il trend di calo statisticamente significativo che si osserva da cinque anni consecutivi, con una diminuzione media del 12% per anno (Figura 10). Il tasso di notifica europeo di casi confermati di salmonellosi è stato di 23,7 casi 100.000 abitanti, variando da 2,1 nel Portogallo a 100,1 nella Repubblica Ceca, nella Germania e nel Regno Unito. La Polonia ha contribuito alla metà (56,0%) dei casi di malattia per il 2009. Si presuppone che la riduzione osservata sia principalmente attribuibile all'implementazione con successo dei programmi di riduzione nazionali di *Salmonella* nelle popolazioni

animali (soprattutto nel pollame), ma anche ad altre misure di controllo applicate lungo la catena alimentare (EFSA e ECDC, 2011).

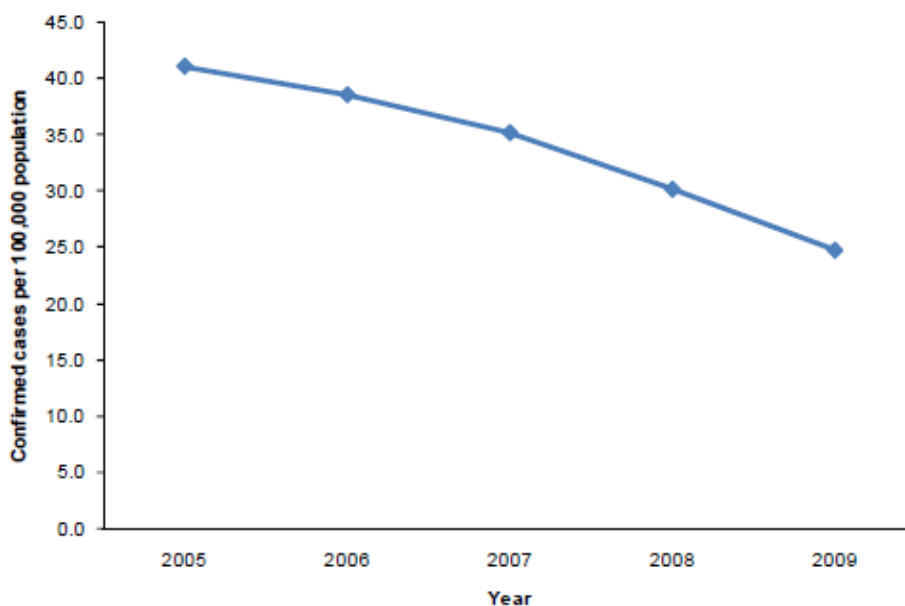


Figura 10: tassi di notifica di casi segnalati di salmonellosi umana confermati per gli anni dal 2005 al 2009 in Europa e in Italia (EFSA e ECDC, 2011).

La Germania ha contribuito per il 45,7% alla riduzione nel numero di casi confermati di malattia. Nonostante il trend generale di diminuzione rispetto all'anno 2008, quattro Paesi hanno visto un aumento dei casi, tra cui l'Austria, la Romania, la Spagna e l'Italia, che hanno contribuito per il 39,5% dell'aumento dei casi confermati nei quattro stati. La più alta proporzione di aumenti di casi (77,1%), tuttavia, si è registrata in Romania

e ciò potrebbe riflettere i miglioramenti legati al sistema di sorveglianza interno. Approssimativamente nell'anno 2009 ci sono stati 90 decessi nell'Unione Europea dovuti ad infezioni di *Salmonella*. Come gli anni precedenti, il più alto tasso di notifica è stato registrato per le fasce di età comprese tra 0-4 anni e tra 5-14 anni. Un picco stagionale si è osservato durante la fine dell'estate e l'inizio dell'autunno. Infine, la proporzione dei casi "domestici" è rimasta invariata nel 2009 rispetto al 2008 (62,4% contro 63,6%), sebbene per alcuni Paesi i casi "import" rappresentino la maggior parte del totale dei casi di salmonellosi (EFSA e ECDC, 2011).

I sierotipi più frequenti in caso di patologia umana sono *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, con percentuali del 52,3% e il 23,3%, rispettivamente, sul totale dei ceppi isolati in casi di malattia (Figura 11).

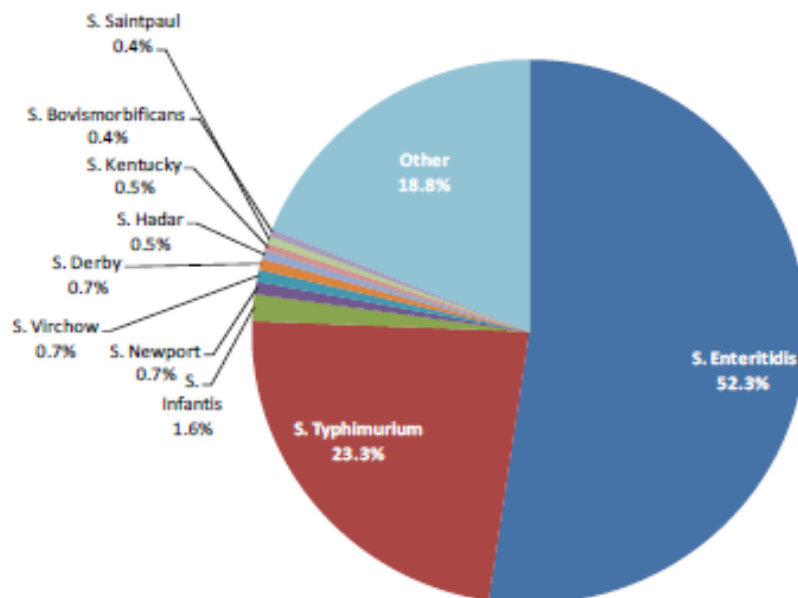


Figura 11: distribuzione dei 10 sierotipi di *Salmonella* spp. più frequenti nei casi di patologia umana nel 2009 (EFSA e ECDC, 2011).

Gli esiti infausti della malattia sono stati pari allo 0,08% sul totale dei 53.167 casi per i quali è stato riportato il sierotipo. Tuttavia *S. Enteritidis* è soprattutto associata al consumo di carne di pollame o uova, mentre *S. Typhimurium* a carne di suino, pollo e bovino contaminata (EFSA e ECDC, 2011).

I sierotipi più frequentemente isolati dai suini da riproduzione in Italia sono *S. Derby*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. London*, *S. Anatum*, *S. Livingstone*, che mostrano prevalenze di allevamenti positivi pari a 31,8%, 13,6%, 4,5%, 4,5%, 4,5% e 4,5% rispettivamente. Gli allevamenti da ingrasso invece hanno la seguente distribuzione di sierotipi: *S. Derby* (28%), *S. Typhimurium* (13,3%), *S. London* (9,3%), *S. Anatum* (9,3%), *S. Bredeney* (2,7%), *S. Livingstone* (1,3%) e *S. Infantis* (1,3%). Nella carne di suino il sierotipo più frequentemente isolato è stato *S. Derby* (24,9%), seguito da *S. Typhimurium* (16,5%), *S. Rissen* (9,0%), *S. London* (7,7%), *S. Manhattan* (3,3%), *S. Infantis* (2,8%), *S. Brandenburg* (2,6%), *S. Livingstone* (0,5%) e *S. Enteritidis* (0,3%) (EFSA e ECDC, 2011).

Tra gli alimenti, *Salmonella* è più frequentemente isolata nella carne di pollo, di tacchino e di suino, con prevalenze rispettivamente di 5,4%, 8,7% e 0,7%. La carne di bovino invece è risultata positiva per la presenza di *Salmonella* spp. solo nello 0,2% dei campioni. Il microrganismo viene riscontrato raramente in altri generi alimentari, come i prodotti lattiero-caseari, la frutta e la verdura (0,6%). Tuttavia una maggiore prevalenza si è

registrata nelle erbe aromatiche e nelle spezie. *Salmonella* spp., infine, è stata ritrovata in basse percentuali nelle uova e nei prodotti derivati, rispettivamente con livelli pari a 0,5% e 0,6% (EFSA e ECDC, 2011).

Le informazioni relative alla carne di suino e i prodotti derivati derivano da i campionamenti eseguiti negli impianti di macellazione e di sezionamento. La prevalenza di *Salmonella* spp. nella carne fresca è stata pari allo 0,7% nel 2009, più o meno stabile rispetto al 2008 (0,8%) e leggermente inferiore al 2007 (1,2%). La Finlandia, la Svezia e la Norvegia non hanno comunicato casi di positività al macello, mentre la Repubblica Ceca, la Germania, l'Ungheria, la Polonia e la Romania hanno registrato livelli molto bassi. Negli impianti di sezionamento *Salmonella* spp. ha raggiunto livelli di positività pari al 5,5% mentre a livello di vendita la percentuale di positività è scesa al 3,5% (EFSA e ECDC, 2011).

A livello europeo è attivo da molti anni un sistema di sorveglianza delle salmonellosi, costituito dalla rete Enter-net: nello specifico riguarda le infezioni umane da *Salmonella* spp. e da *E. coli* vero citotossici (VTEC). A partire dal 2002 inoltre è stata attivata a livello nazionale una struttura parallela al sistema, che riguarda la raccolta di dati sugli isolamenti di *Salmonella* spp. da campioni di origine veterinaria, che prende il nome di Enter-vet. I nodi della rete sono gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, con il coordinamento del Centro Nazionale di Referenza per le Salmonellosi,

sito presso l'IZS delle Venezie. Gli Istituti sono tenuti a inviare al Centro di Referenza i dati relativi alla tipizzazione dei ceppi di *Salmonella* attraverso un sistema informatizzato, assieme agli stipiti di *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* per la tipizzazione fagica. Alla fine tutti i dati vengono inviati dal Centro di Referenza all'Istituto Superiore di Sanità.

Il problema della resistenza agli antibiotici nei batteri è stato negli ultimi anni oggetto di studio e discussione, sia a livello scientifico che istituzionale. Le possibili correlazioni animale-uomo per quanto riguarda l'antibiotico-resistenza derivano dal fatto che la somministrazione di antibiotici agli animali induce la selezione e la colonizzazione intestinale da parte di ceppi resistenti, l'escrezione dei quali comporta la contaminazione degli alimenti derivati e la diffusione dei ceppi stessi nell'ambiente. Qualora si tratti di batteri zoonotici è chiaro che questi possono infettare l'uomo portando con sé le resistenze acquisite nell'animale. Tuttavia, anche se non si tratta di microrganismi patogeni per l'uomo, esiste un serio rischio di aumento del pool ambientale di geni di resistenza, con possibilità di scambio di materiale genetico (tra cui i determinanti genetici di resistenza) fra i batteri di generi diversi. I fattori che influenzano l'insorgenza di questo fenomeno sono molteplici ed includono la concentrazione del farmaco, la durata dell'esposizione, il tipo di microrganismo e di principio attivo e lo stato immunitario dell'ospite. In generale, l'esposizione a basse quantità di farmaco per periodi prolungati

ha un potenziale selettivo maggiore rispetto all'uso prettamente terapeutico, caratterizzato da somministrazioni a dose piena per periodi limitati. I punti che destano maggiore preoccupazione sono i trattamenti di massa in allevamento intensivo per la terapia e la profilassi delle infezioni batteriche e l'uso di antibiotici nella pratica zootecnica come promotori di crescita ad uso auxinico. Pertanto attualmente è stato bandito nella Comunità Europea l'utilizzo di vari farmaci impiegati come auxinici, tra cui virginiamicina, avoparacina, tilosina, spiramicina e zincobacitracina. Il fine è quello di cautelarsi dall'insorgenza di fenomeni di resistenza nei confronti di antibiotici strutturalmente simili a quelli utilizzati nella terapia umana, come la vancomicina, i macrolidi e le sinergistine (Ricci, 2005). Gli antibiotici di scelta per la cura delle infezioni da *Salmonella* sono i fluorochinoloni per gli adulti e le cefalosporine di terza generazione per i bambini. Le resistenze emergenti del microrganismo verso questi antibiotici utilizzati per il trattamenti di prima scelta potrebbero esitare in interventi inefficaci, che potrebbero essere legati anche ad esiti infausti della malattia. I livelli di resistenza più elevati in tutti i ceppi isolati nel 2009 in Europa dai casi umani sono stati riscontrati verso l'ampicillina (24,2%) e verso le tetracicline (21,9%). In Italia, gli antibiotici testati hanno presentato le seguenti prevalenze di resistenza in *Salmonella* spp.: cloramfenicolo 8,9%, cefotaxime 1,2%, ciprofloxacina 0,6%, gentamicina 45,2%, kanamicina 3,9%, ampicillina 53,3%, acido nalidixico 11,3%,

streptomicina 52,1%, sulfonamidi 55,3%, tetracicline 51,8%, trimethoprim 9,4%. *S. Typhimurium* ha mostrato le resistenze più alte verso ampicillina (55,9%), tetracicline (52%), sulfonamidi (46,4%) e streptomicina (39,2%). Verso i due antibiotici più importanti dal punto di vista terapeutico, *S. Typhimurium* si è invece dimostrata spesso sensibile, con livelli di resistenza bassi pari a 2,3% per la ciprofloxacina e a 0,6% nei confronti del cefotaxime. I ceppi di *Salmonella* spp. isolati dalla carne di suino, a livello europeo, hanno evidenziato una resistenza abbastanza comune verso ampicillina, sulfonamidi e tetracicline, con livelli di resistenza rispettivamente di 47%, 52% e 54%. Questi valori medi sono stati abbastanza uniformi per tutti gli Stati Membri. La gentamicina invece si è rivelata un antibiotico efficace con prevalenze di resistenza generali sull'1% tra i ceppi testati. Anche l'acido nalidixico e la ciprofloxacina hanno avuto basse frequenze di antibiotico resistenza, che si è attestata al 3% per entrambe, mentre il 2% è stato il livello di resistenza verso il cefotaxime (EFSA e ECDC, 2011a).

Un'indagine eseguita all'interno dell'Unione Europea negli anni 2006 e 2007 sulla presenza di *Salmonella* spp. nei linfonodi di suini da carne negli impianti di macellazione ha mostrato livelli di prevalenza pari a al 10,3% tra i 24 Stati partecipanti (EFSA, 2008). Durante la stessa ricerca la contaminazione delle carcasse si è attestata su un valore pari all'8,3%, per i 13 Stati Membri che hanno fornito i dati (EFSA, 2008). Per quanto

riguarda le prevalenze di infezione a livello di produzione primaria, *Salmonella* spp. è stata riscontrata nell'31,8% degli allevamenti tra i 24 Stati Membri, che hanno partecipato allo studio messo in atto per fornire i dati di diffusione del microrganismo nell'anno 2008 (EFSA, 2009). Relativamente all'anno 2009 l'Italia ha registrato nella popolazione suina (a livello di allevamento) una prevalenza di infezione pari al 6,8% (EFSA e ECDC, 2011).

Sebbene ci siano molte vie di trasmissione della salmonellosi, la maggior parte delle infezioni umane sono causate dal consumo di alimenti contaminati di origine animale. La carne di suino e i prodotti derivati sono stati implicati in un numero elevato di episodi tossinfettivi, dove *S. Typhimurium* è il sierotipo predominante nei casi di malattia umana e il suino è un importante serbatoio di questo microrganismo. Il Gruppo di ricerca sui Pericoli Biologici dell'EFSA (BIOHAZ) per questo motivo ha valutato il rischio per salute pubblica derivante da *Salmonella* spp. nei suini e l'impatto delle possibili strategie di intervento (EFSA 2006). In primo luogo tutti i sierotipi che vedono come serbatoio di infezione il suino devono essere considerati un pericolo e non ci sono differenze tra loro nel costituire un rischio per la salute pubblica: infatti sebbene *S. Typhimurium* sia la causa più frequente di infezione, ci sono stati molti focolai tossinfettivi causati da altri sierotipi (EFSA, 2006). Le opzioni disponibili per l'implementazione di schemi di monitoraggio epidemiologico sono

essenzialmente due e sono utili per valutare la prevalenza attuale e le infezioni pregresse. Queste opzioni si basano su metodiche batteriologiche o immunologiche, che, se utilizzate correttamente per specifici scopi, possono apportare grossi benefici. Infatti non forniscono risultati equivalenti e pertanto non possono essere comparate direttamente. La scelta sull'impiego di tecniche analitiche immunologiche o batteriologiche, o la loro attuazione in combinazione, dipende dalla situazione da indagare e sui quesiti che devono essere risolti. La batteriologia ha i vantaggi di consentire: l'isolamento di un ceppo per eseguire procedure ulteriori di identificazione; il reperimento di informazioni relative a tutti i sierotipi che causano infezioni; l'esecuzione di test per saggiare l'antibiotico-resistenza; la determinazione dello stato corrente di infezione dei singoli animali; la valutazione dello stato di indennità da *Salmonella* spp. in una popolazione animale. Al contrario le metodiche immunologiche, basate su test ELISA, sono utili per: l'attività di screening di grandi numeri di campioni di sangue e o di altra fonte; la valutazione dell'efficacia dei programmi di controllo dell'infezione in aree endemiche; la determinazione del corrente stato immunologico di una popolazione e della prevalenza di infezione (EFSA, 2006).

Sulla base delle indicazioni fornite attraverso gli schemi di monitoraggio possono essere improntate ed implementate opzioni per la riduzione del rischio *Salmonella* spp. lungo la filiera di produzione suina

(EFSA, 2006). La prima linea di intervento deve essere basata sul controllo di *Salmonella* spp. negli animali produttori di alimenti (Pre-harvest control), costituiti quindi dalla popolazione suina. La seconda linea è rappresentata dal miglioramento delle condizioni igieniche durante la macellazione e le ulteriori operazioni di preparazione della carne (Harvest control). Infine è necessario concentrare l'attenzione sulle misure da mettere in atto durante la preparazione finale degli alimenti, focalizzandosi sull'educazione sia degli operatori dell'industria alimentare che del consumatore finale per l'applicazione di misure igieniche efficaci (Post-harvest control) (EFSA, 2006).

Bisogna tenere presente che il controllo di *Salmonella* spp. lungo la filiera produttiva si ottiene attraverso l'implementazione di misure preventive. Nello specifico le azioni da mettere in atto a livello di produzione primaria dovrebbero essere indirizzate alla prevenzione dell'introduzione del microrganismo nel gruppo di animali, della trasmissione interna al gruppo e all'aumento della resistenza all'infezione. Il fattore di rischio primario per *Salmonella* è rappresentato dall'introduzione di animali con infezione subclinica, ma anche la gestione igienica ha la sua rilevanza per limitare la diffusione. Sono da considerare pertanto sistemi di vuoto sanitario (all-in/all-out), controllo dei roditori e degli animali indesiderati (cani, gatti e uccelli), igiene dei visitatori e prevenzione del contatto diretto con gli animali allevati. Anche il controllo

della contaminazione da *Salmonella* spp. nei mangimi è basilare, per l'alto potenziale di diffusione ad un grande numero di aziende. Determinati tipi di mangime, come il pellet, sono associati ad un rischio maggiore, mentre altri, come l'alimento umido o il siero di latte, ad una riduzione dell'esposizione (EFSA, 2006). D'altra parte nelle fasi successive della filiera produttiva (Harvest e Post-harvest) nessuna misura è in grado di eliminare completamente il pericolo *Salmonella* spp. La giusta combinazione di misure verticali e orizzontali per prevenire la trasmissione rappresentano la via più efficace, come nel caso di molti altri patogeni alimentari. L'attività di monitoraggio svolta è importante per valutare l'igienicità dei processi e per determinare lo stato corrente relativamente a *Salmonella* spp. lungo la catena alimentare e quindi l'esposizione al rischio da parte dell'uomo. La riduzione delle cariche microbiche negli animali ancora in vita, durante il trasporto e la permanenza nelle stalle di sosta, può essere ottenuta attraverso la separazione dei gruppi di provenienza diversa, l'applicazione delle buone pratiche igieniche (GHP) e la gestione ottimale dei tempi di trasporto e sosta prima della macellazione. La macellazione e le successive operazioni di toelettatura devono essere eseguite con un alto livello igienico, in accordo con i principi del sistema HACCP, associati alle GHP. Molto importante è, a proposito, evitare la contaminazione fecale diretta ed indiretta delle carcasse. Come prospettiva futura potranno essere considerate azioni di decontaminazione diretta delle carcasse in situazioni

specifiche, sotto la supervisione dell'autorità competente. Tuttavia queste misure non possono sostituire le precedenti raccomandazioni. Un altro fattore essenziale per ridurre il rischio durante la processazione delle carcasse è il mantenimento rigido della catena del freddo, attraverso azioni di monitoraggio della temperatura ambientale (EFSA, 2006). Infine a livello di vendita al dettaglio e di consumatore finale sono necessarie la manipolazione igienica degli alimenti, un'adeguata conservazione a temperatura di refrigerazione e il riscaldamento della carne adeguato ad inattivare il microrganismo (EFSA, 2006).

L'EFSA ha individuato sette indicatori epidemiologici per monitorare e valutare la presenza di *Salmonella* spp. nel suino da carne, di cui tre riguardano gli stabilimenti di macellazione (EFSA, 2011a):

1. Fase di eviscerazione (Harmonised Epidemiological Indicator HEI 5): analisi del contenuto intestinale per analisi microbiologiche (isolamento e sierotipizzazione);
2. Termine della macellazione prima della refrigerazione (Harmonised Epidemiological Indicator HEI 6): analisi di tamponi superficiali delle carcasse per analisi microbiologiche (isolamento e sierotipizzazione);
3. Termine della macellazione dopo la refrigerazione (Harmonised Epidemiological Indicator HEI 7): analisi di tamponi superficiali

delle carcasse per analisi microbiologiche (isolamento e sierotipizzazione).

Le analisi microbiologiche e la tipizzazione sierologica di *Salmonella* spp. forniscono dati relativi a nuovi sierotipi zoonotici emergenti, come la variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium. I ceppi specifici di *Salmonella* spp. di particolare rilevanza per la salute pubblica, dotati di particolare virulenza o resistenti verso gli antibiotici di importanza strategica per la cura delle infezioni, possono essere individuati e monitorati. Il campionamento del contenuto ciecale è preferibile rispetto ai linfonodi ileo-ciecali dato che è più semplice da attuare a livello pratico ed è un indicatore più sensibile per le infezioni recenti da *Salmonella* durante il trasporto e la sosta pre-macellazione (EFSA, 2011a).

Il primo indicatore (HEI5) è focalizzato sul fornire dati sullo stato di prevalenza dell'infezione da *Salmonella* spp. nei suini avviati alla catena di macellazione. Il tipo di campione consente di valutare le condizioni di allevamento, l'adeguatezza del tempo di trasporto e le relative condizioni, il grado di rimescolamento di animali con origini diverse, le condizioni e le pratiche di permanenza nelle stalle di sosta. La sierotipizzazione e metodiche di tipizzazione più dettagliate basate su analisi genetiche infine servono a differenziare le infezioni occorse in allevamento o durante le fasi successive (EFSA, 2011a).

Il secondo indicatore per *Salmonella* spp. (HEI6) è relativo alle procedure igieniche messe in atto nel corso della macellazione, misurando la presenza del microrganismo sulla carcassa prima della refrigerazione. Questo consente di isolare il batterio più facilmente, che dopo il raffreddamento: l'adesione attiva alla carcassa e lo stress che subisce *Salmonella* durante la refrigerazione riducono infatti le probabilità di isolamento. Dalla combinazione dei risultati con l'indicatore precedente è possibile valutare la capacità del processo di macellazione nel contenere la contaminazione batterica della carcassa (EFSA, 2011a).

Il terzo e ultimo punto (HEI 7) indica lo stato delle carcasse al termine dell'intero processo di macellazione, includendo anche la refrigerazione e l'eventuale sezionamento. Pertanto il livello di contaminazione in questa fase riflette il livello di *Salmonella* spp. che effettivamente entra nella catena alimentare a partire dall'impianto di macellazione. Questi dati sono utili per ogni macello per fissare i propri target relativamente al pericolo *Salmonella* spp. (EFSA, 2011a).

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes è l'agente eziologico della listeriosi e fu scoperta circa 90 anni fa. Il microrganismo può essere ritrovato a livello intracellulare all'interno dei monociti e dei granulociti neutrofili: il suo nome deriva appunto dall'osservazione che si manifesta un aumento del numero di monociti nel sangue periferico dei soggetti infetti. Nel 1929 il microrganismo fu isolato per la prima volta dal sangue di un essere umano con una patologia simile alla mononucleosi. Al microrganismo fu attribuito il genere *Listerella* in onore del chirurgo Lord Lister. Il genere in seguito fu cambiato in *Listeria* nel 1940, per questioni tassonomiche. Risale solo al 1980 però il suo riconoscimento come importante agente patogeno a trasmissione alimentare. Infatti le infezioni da *L. monocytogenes* hanno un'elevata mortalità, sopravanzando persino *Clostridium botulinum* e *Salmonella* spp. Per questo motivo si ipotizza che la listeriosi sia la malattia di origine alimentare con il maggior numero di decessi negli Stati Uniti (Martin *et Fisher*, 1999).

La classificazione tassonomica

Il genere *Listeria* appartiene, insieme al genere *Bronchothrix*, alla famiglia delle Listeriaceae, a sua volta raggruppata nell'ordine delle Bacillales con le famiglie Bacillaceae e Staphylococcaceae (Fabbi *et al.*,

2005). Il numero di specie riconosciute come appartenenti al genere *Listeria* è variabile tra gli autori. In linea generale sono incluse 5 specie: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua* e *L. welshimeri*. In aggiunta di recente, sono state incluse le specie *L. grayi* e *L. murrayi*. *L. monocytogenes* è riconosciuta essere patogena per l'uomo e per gli animali, mentre *L. ivanovii* è un patogeno animale. Le altre specie invece sono considerate genericamente non patogene. Tuttavia sia *L. innocua* che *L. seeligeri* sono state occasionalmente associate ad episodi di malattia nell'uomo. Tuttavia, *L. monocytogenes* è ritenuta la specie di interesse maggiore per quanto riguarda la patologia umana (Martin *et* Fisher, 1999).

Le caratteristiche morfologiche e culturali

L. monocytogenes è un microrganismo cocco-bacillare di piccole dimensioni (0,5-2,0µm di lunghezza e 0,4-0,5 µm di diametro), Gram-positivo. Ha un metabolismo energetico di tipo anaerobio facoltativo e non è sporigeno. Nelle colture batteriche vecchie può apparire in lunghi filamenti o può assumere una forma bacillare particolarmente allungata, condizione che si manifesta anche quando il microrganismo cresce in condizioni ambientali avverse. *L. monocytogenes* è mobile grazie alla presenza di flagelli peritrichi ed è caratterizzata dal tipico movimento di rotazione testa-coda quando si sviluppa a temperature inferiori a 25°C, caratteristica che scompare a 37°C. Per questo motivo, quando il batterio

viene inoculato in un terreno semi-solido e viene incubato a 25°C, appare evidente un'area di crescita a forma di ombrello, 3-5mm sottostanti la superficie (Martin *et* Fisher, 1999).

Le caratteristiche colturali di *L. monocytogenes* sono contraddistinte dalla necessità di almeno quattro vitamine del gruppo B (biotina, riboflavina, tiamina e acido tiocico) e di molti amminoacidi, tra cui la cisteina, la glutamina, l'isoleucina e la valina. D'altra parte, naturalmente, anche i carboidrati sono essenziali per la crescita, tra i quali il glucosio è il più importante. Bisogna ricordare che in condizioni anaerobiche solamente gli esosi e i pentosi sostengono la crescita. In aerobiosi possono essere utilizzati il maltosio e il lattosio, ma non il saccarosio. Il microrganismo cresce bene quindi nei terreni colturali ricchi di elementi nutritivi, come il brodo soia triptone e il Brain-Heart Infusion (BHI). Sui terreni agarizzati, le colonie sono di piccole dimensioni (0,5-1,5mm di diametro dopo 24-48 ore di incubazione), tondeggianti e traslucide. La colorazione è grigio – bluastro sotto condizioni di normale illuminazione, ma assume una connotazione blu – verdastra quando le colonie sono esposte ad un fascio di luce obliquo. Una crescita soddisfacente si ottiene anche su terreni agarizzati contenenti sangue, sui quali le colonie sono circondate da una sottile area di beta-emolisi. Tuttavia, soprattutto i ceppi isolati da materiale fecale e da fonti ambientali sono frequentemente non emolitici (Martin *et* Fisher, 1999).

La classificazione antigenica

La superficie cellulare di *L. monocytogenes* è tipica dei microrganismi Gram-positivi. La parete cellulare è dotata di uno strato spesso e omogeneo che circonda la membrana citoplasmatica: il 35% dell'intera parete cellulare secca è rappresentato dallo strato di peptidoglicano. D'altra parte il contenuto di glicosamina è alto e gli acidi tecoici sono legati covalentemente con lo strato di glicani, costituendo circa il 60-70% della parete cellulare. Gli acidi lipotecoici, infine, sono anch'essi presenti e assomigliano al lipopolisaccaride dei batteri Gram-negativi, sia per la struttura che per la funzione biologica (Martin *et Fisher*, 1999). La classificazione antigenica si basa su l'antigene somatico O e su quello flagellare H. I sierotipi vengono identificati mediante il raggruppamento sierologico di 5 antigeni flagellari sensibili al calore, indicati con lettere da a fino ad e, e 14 antigeni somatici stabili al calore contenenti carboidrati, identificati con un numero da I a XIV, variabilmente associati. Pertanto, i sierotipi riconosciuti che possono causare malattia sono 13: 1/2 a, 1/2 b, 1/2 c, 3 a, 3 b, 3 c, 4 a, 4 ab, 4 b, 4 c, 4 d, 4 e e 7. Tuttavia i sierotipi 1/2 a, 1/2 b e 4 b sono quelli predominanti (92%) tra i ceppi isolati dall'uomo e dagli animali (Fabbi *et al.*, 2005). Diversi studi hanno rivelato fenomeni di cross-reattività con alcuni ceppi appartenenti ai generi *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia* e *Corynebacterium*. Al momento non è stata scoperta alcuna correlazione tra il sierotipo specifico e una particolare

forma clinica o un ospite preciso. La classificazione dei sierotipi ha un significato epidemiologico importante, essendoci una precisa e netta distribuzione geografica di questi, come ad esempio si osserva per il sierotipo 4 b, che è quello predominante negli Stati Uniti, in Canada ed in Europa (Martin *et Fisher*, 1999).

Le caratteristiche fisiologiche

Importanti, come del resto per tutti gli altri microrganismi, sono le caratteristiche fisiologiche, per poter controllare la crescita e arrestare la moltiplicazione o per considerare opzioni utili per eliminare *Listeria monocytogenes* dagli alimenti. L'attività dell'acqua minima richiesta per la crescita è di 0,90 e arriva fino a 0,97 (Martin *et Fisher*, 1999).

L'influenza del pH è stata studiata sia in termini di valore assoluto di acidità che di tipologia di acidificante utilizzato, soprattutto nel campo dei prodotti lattiero – caseari. Per valori di pH inferiori a 5, il tempo di sopravvivenza è notevolmente ridotto, anche se il microrganismo potrebbe crescere a temperature superiori a 13°C. L'acido acetico mostra l'effetto maggiormente inibente verso la crescita, seguito dall'acido lattico e da quello citrico, proporzionalmente al grado di dissociazione. Nello specifico il pH inibente alla temperatura di 4°C è di 5 in presenza di acido propionico, 4,5 per l'acido acetico e lattico e 4 per il citrico e il cloridrico. Questi elementi (temperatura, tipo di acidificante e pH) devono essere

considerati nella loro totalità quando si vuole valutare l'influenza sulla crescita e sulla sopravvivenza di *L. monocytogenes* (Martin *et* Fisher, 1999).

L. monocytogenes è considerata un microrganismo psicrotrofo, capace di crescere alle temperature di refrigerazione, sebbene l'*optimum* per la moltiplicazione sia tra 30°C e 37°C. La cinetica di crescita è dipendente dall'interazione di diverse variabili. La temperatura minima media per la crescita è fissata a 1,1°C \pm 0,3°C, anche se i ceppi emolitici crescono più facilmente alle temperature di refrigerazione rispetto a quelli non emolitici. I tempi di generazione variano da 1,2 a 1,7 giorni per temperature rispettivamente di 4°C e 5°C, fino a 7,2, 0,65-0,69 ore a 13°C e 35°C. In ogni caso la temperatura minima di crescita registrata è pari a -0,1°C / -0,4°C. La temperatura influenza anche la virulenza: la moltiplicazione a 4°C aumenta significativamente la virulenza rispetto alla crescita a 37°C; in aggiunta si riduce notevolmente anche la sensibilità all'inattivazione da parte dei neutrofili (Martin *et* Fisher, 1999).

Il cloruro di sodio è frequentemente aggiunto agli alimenti per migliorare il sapore e come agente di riduzione dell'attività dell'acqua. Tuttavia *L. monocytogenes* tollera concentrazioni saline del 10% e può sopravvivere fino ad 1 anno con il 16% di NaCl. Tuttavia si osserva un aumento della sensibilità al sale nelle cellule batteriche stressate dalle alte temperature. Basse concentrazioni saline (4-6%) migliorano la

sopravvivenza a valori di pH inibenti mentre dosi più elevate la riducono (Martin *et Fisher*, 1999).

Sebbene l'atmosfera modificata sia spesso utilizzata come mezzo per aumentare la conservabilità degli alimenti, *L. monocytogenes* aumenta il tasso di crescita a basse concentrazioni di ossigeno o in presenza di diossido di carbonio. Anche altri tipi di atmosfera modificata non incidono significativamente nel limitarne la crescita. A riguardo è importante sottolineare che sotto condizioni anaerobiche strette è migliorata la ripresa delle cellule batteriche danneggiate dall'esposizione al calore (Martin *et Fisher*, 1999).

I fattori di virulenza e la patogenesi dell'infezione

Sono molti i fattori di virulenza di cui dispone *L. monocytogenes*. In primo luogo, i batteri appartenenti a questo genere sopravvivono molto bene fuori dall'ospite nell'ambiente esterno e possono andare incontro a modificazioni morfologiche per adattarsi alle condizioni esterne (Martin *et Fisher*, 1999). Molti geni che codificano per fattori di virulenza sono sotto il controllo trascrizionale del fattore di regolazione PrfA (Positive Regulatory Factor A). L'espressione delle proteine dipendenti da PrfA è controllata da molti parametri ambientali come temperatura, pH, condizioni di stress e composizione del terreno di crescita (Fabbi *et al.*, 2005). I flagelli possono giocare un ruolo importante nel favorire la sopravvivenza

di *Listeria*, specialmente in ambienti ostili. È noto che la temperatura e l'osmolarità influenzano l'espressione dei flagelli. Ad esempio a 37°C la loro produzione è molto ridotta e la mobilità è limitata. A temperature comprese tra 20°C e 25°C invece si formano dei flagelli peritrichi, che conferiscono una mobilità molto vigorosa (Martin *et Fisher*, 1999).

L. monocytogenes è un patogeno intracellulare facoltativo, il cui meccanismo patogenetico ha inizio con l'invasione delle cellule ospiti, con conseguente moltiplicazione nel citoplasma e passaggio alle cellule adiacenti. L'invasione cellulare avviene per fagocitosi oppure tramite un meccanismo mediato da recettori (Fabbi *et al.*, 2005). I fattori di virulenza identificati per *L. monocytogenes* comprendono quelli coinvolti nell'invasione delle cellule epiteliali (InlA e InlB), nell'uscita dai fagolisosomi (Hly e PlcA), nei movimenti intra- ed inter-cellulari (ActA) e nella lisi dei vacuoli cellulari a doppio strato (PlcB). Tutti questi fattori di virulenza sono codificati a livello genetico nei rispettivi geni, che sono raggruppati nella stessa regione del cromosoma, eccetto il gene *inl*. In aggiunta, gli enzimi catalasi (CAT) e superossido dismutasi (SOD) possono funzionare come fattori di virulenza secondari, degradando i radicali liberi dell'ossigeno che svolgono la loro azione tossica all'interno dei fagociti macrofagi (Martin *et Fisher*, 1999).

La listeriolisina O è posseduta da tutti i ceppi virulenti di *Listeria* ed è costituita da una emolisina extracellulare. Ha la capacità di lisare non solo

gli eritrociti, ma anche le membrane delle cellule eucariotiche in genere. La sua assenza causa una perdita netta di virulenza, sottolineando la sua funzione molto importante nel corso dell'infezione. La perdita di questa emolisina riduce significativamente il tasso di sopravvivenza all'interno dei macrofagi e i batteri possono essere così eliminati rapidamente dagli animali infetti (Martin *et Fisher*, 1999).

La fosfolipasi C è un enzima che è codificato nel cromosoma di *Listeria* in due geni distinti. La sua funzione è quella di distruggere le membrane cellulari dell'ospite attraverso l'idrolisi dei fosfolipidi, come il fosfatidilinositolo e la fosfatidilcolina. Per questo motivo è un fattore importante nella disseminazione intracellulare del batterio e nella fuoriuscita dal fagolisosoma all'interno delle cellule immunitarie (Martin *et Fisher*, 1999).

Le forme di malattia nell'uomo

L. monocytogenes è stata spesso causa dei focolai infettivi ad origine alimentare più letali della storia. Tuttavia la maggior parte dei casi di Listeriosi umana avvengono come casi sporadici di malattia. Le condizioni intrinseche dei soggetti colpiti, come lo stato di gravidanza, la terapia a base di steroidi, il cancro, le patologie renali o epatiche, il diabete, le infezioni da HIV e i trapianti d'organo sono tutti fattori predisponenti di rischio: le fasce di persone maggiormente sensibili all'infezione infatti sono

le categorie con il sistema immunitario non perfettamente efficiente, cioè i soggetti individuati con l'acronimo YOPI (giovani, anziani, donne in gravidanza e immuno-depressi). Infatti, sebbene la listeriosi possa presentarsi in persone di tutte le età, più frequentemente colpisce i soggetti con condizioni che riducono l'immunità cellulo-mediata da parte dei linfociti T (Martin *et Fisher*, 1999).

La malattia può sfociare in una serie di complicazioni varie, tra cui la meningite abbastanza di frequente. Altre condizioni serie che possono essere ricollegabili alla listeriosi nell'uomo sono la setticemia, una sindrome simil-mononucleosica, la polmonite, l'endocardite, l'aneurisma aortico, gli ascessi localizzati, le lesioni cutanee, la congiuntivite, l'epatite e l'uretrite. Una manifestazione grave dell'infezione da *Listeria* è rappresentata dall'infezione intra-uterina nelle donne gravide. Le conseguenze possono essere l'aborto, la morti-natalità del feto e la meningite nel neonato. Queste conseguenze si osservano con maggiore frequenza nel corso del terzo trimestre di gravidanza. Pertanto possono essere individuate due forme di listeriosi neonatale: una a rapida comparsa nel neonato e una che si manifesta più tardi. Nella prima, i sintomi si presentano entro i primi due giorni di vita e il microrganismo si localizza in molte aree di necrosi diffuse in tutto l'organismo. Risultano più colpiti, nella maggior parte dei casi, il fegato, la milza, i polmoni, i reni ed il cervello. In questo caso la prognosi è sempre infausta. La seconda forma si

manifesta in media dopo 14,3 giorni, soprattutto con meningite. Tuttavia si possono osservare disturbi di respirazione, eruzioni cutanee, congiuntivite, polmonite, ipereccitabilità, vomito, crampi, shock, anomalie ematologiche e ipo- o iper-termia. La maggior parte dei decessi avvengono per polmonite e insufficienza respiratoria. Sebbene una pronta terapia antibiotica aumenti le possibilità di sopravvivenza, tuttavia il tasso di mortalità rimane circa del 36% (Martin *et Fisher*, 1999).

In linea di massima gli individui in buona salute mostrano infezioni generalmente asintomatiche o con sintomatologia puramente gastro-enterica, con leggeri sintomi simil-influenzali, quali febbre, affaticamento, malessere generale, nausea, dolori addominali, vomito e diarrea. La dose infettante del microrganismo è variabile in relazione all'ospite e al ceppo batterico coinvolto, anche se l'ingestione di meno di 1.000 microrganismi è ritenuta sufficiente per produrre la malattia (Martin *et Fisher*, 1999). Nel caso delle epidemie di gastro-enterite febbrile in soggetti adulti non sensibili, la dose infettante si è dimostrata più alta (da $1,9 \times 10^5$ a 1×10^9 UFC/g o ml) rispetto alla forma tipica di listeriosi invasiva che colpisce i soggetti YOPI (Fabbi *et al.*, 2005). Alcuni fattori predisponenti sono gli antiacidi e la cimetidina, che riducono l'efficacia della barriera acida dello stomaco nell'inattivare il microrganismo. Il periodo di incubazione è probabilmente superiore alle 12 ore, per la forma non invasiva. Il tempo necessario per la comparsa di forme molto gravi (invasive) può variare da 3

giorni a settimane. L'indice di mortalità tra i soggetti che non ricevono cure è del 70%. Il trattamento antibiotico con ampicillina o penicillina è generalmente efficace per la risoluzione della listeriosi; antibiotici come il trimethoprim in associazione con il sulfametossazolo possono essere utilizzati come valide alternative nei soggetti allergici agli antimicrobici beta-lattamici (Martin *et Fisher*, 1999).

La patogenesi dell'infezione prevede l'ingestione di cibi contaminati e la necessaria colonizzazione del microrganismo in sede intestinale. In modelli sperimentali si è osservato che le cellule M e le placche del Peyer costituiscono i siti di elezione per l'invasione intestinale. In questa fase, oltre alle strutture di adesione presenti sulla superficie della membrana cellulare, sono molto importanti i flagelli per lo spostamento e l'avvicinamento verso i siti di ingresso target. Successivamente alla traslocazione attraverso la barriera intestinale, *L. monocytogenes* è rinvenibile all'interno dei macrofagi e delle altre cellule fagocitarie nella lamina propria (Martin *et Fisher*, 1999).

L'immunità cellulo – mediata è un fattore critico per determinare la resistenza verso l'infezione da *L. monocytogenes* e coinvolge i fagociti mononucleati, come risposta rapida, e le specifiche cellule T, come risposta secondaria. Quando il microrganismo oltrepassa le barriere dell'ospite, i fagociti, neutrofili o mononucleati, sono importanti per la sua distruzione. I meccanismi utilizzati sono due: il primo è l'eliminazione del contenuto

lisosomiale sulla superficie esterna del batterio e il secondo è rappresentato dalla sintesi di composti ossidanti citotossici, i radicali liberi dell'ossigeno. *Listeria*, inoltre, viene sensibilizzata dai linfociti T con la funzione di attrarre i macrofagi verso i siti di infezione. A questo scopo, i linfociti T liberano anche sostanze attivanti i macrofagi, come l'interferone gamma, aumentando la loro attività fagocitaria. L'attivazione dei linfociti T in ultima analisi comporta anche l'acquisizione di immunità cellulare specifica. Dalla lamina propria, veicolata dalle cellule del sistema immunitario, il batterio si sposta nel fegato e nella milza. Sebbene la maggior parte delle cellule batteriche vengano inattivate dai fagociti, quelle che sopravvivono possono moltiplicarsi negli epatociti (Martin *et Fisher*, 1999).

Per il processo di internalizzazione cellulare sono necessarie proteine di superficie definite internaline, InlA e InlB. Queste si legano ai recettori cellulari dell'ospite, costituiti dall'E-caderina (Martin *et Fisher*, 1999). *L. monocytogenes* è in grado di invadere molti tipi cellulari. L'ingresso nelle cellule non fagocitarie avviene mediante un meccanismo a cerniera (cosiddetto "zipper"), che coinvolge una proteina batterica, l'internalina, ed un recettore cellulare (Fabbi *et al.*, 2005). Una volta che si trova all'interno della cellula, *L. monocytogenes* è racchiusa in una vescicola di membrana. L'uscita da questa struttura è possibile grazie a due fattori di virulenza, la listeriolisina O e la fosfolipasi C (Martin *et Fisher*, 1999). L'emolisina (la

listeriolisina O), una volta secreta dal batterio, lega il colesterolo presente sulla membrana, attuando una polimerizzazione, e forma un poro. In seguito il pH interno del vacuolo (il fagosoma) si innalza, bloccando la sua maturazione e permettendo alla fosfolipasi C di dissolvere la membrana vacuolare (Fabbi *et al.*, 2005). Quando il batterio ha ottenuto la sua libertà nel citoplasma della cellula ospite, ha luogo una moltiplicazione molto rapida seguita da spostamenti intra- ed inter-cellulari, possibili grazie allo sfruttamento dei filamenti di actina. La polimerizzazione dell'actina in lunghi filamenti è una reazione catalizzata da una proteina di superficie di *Listeria* nota come ActA, che è codificata a livello cromosomico nel gene *actA*. Pertanto a livello intracellulare il batterio sembra coperto da una nuvola di filamenti di actina, che assomigliano ad una “coda di cometa”. Attraverso questo meccanismo di propulsione le cellule batteriche sono spinte verso la membrana di cellule adiacenti, formando delle protrusioni che consentono una nuova internalizzazione e il ripetersi del ciclo (Martin *et Fisher*, 1999).

L'epidemiologia del microorganismo

Listeria monocytogenes è un microorganismo ubiquitario ampiamente diffuso nell'ambiente, che è stato isolato da una varietà molto eterogenea di fonti: suolo, vegetali (soprattutto in decomposizione), foraggi insilati, materiale fecale e acque superficiali reflue. Il microorganismo è resistente a

varie condizioni ambientali come l'alta salinità o l'acidità e può moltiplicarsi nel terreno e nell'acqua. Infatti *Listeria* spp. è stata isolata da diversi ambienti acquatici: acque di superficie di canali e laghi, canali di terreni bonificati, acque dolci affluenti al mare e acque di scolo. Pertanto la presenza di *Listeria* spp. nel suolo è da ritenersi legata all'impiego di acque contaminate, a vegetali in decomposizione e a materiale fecale, che costituiscono nell'insieme un ambiente fresco e umido ideale per la sopravvivenza e la crescita del microrganismo. È dimostrato, a riguardo, che anche dopo tre mesi dalla contaminazione sperimentale del terreno, i vegetali cresciuti risultano contaminati (Fabbi *et al.*, 2005). Il batterio è anche associato con molte specie di mammiferi, almeno 37, tra cui si ricordano pecore, bovini, suini, cani e specie avicole (Martin *et Fisher*, 1999). A conferma della contaminazione di tipo ambientale, vi è l'isolamento abbastanza frequente di *L. monocytogenes* da feci di numerose specie di animali sani (10-50% dei bovini, polli e suini) e portatori umani (1-5% della popolazione) (Fabbi *et al.*, 2005). Pertanto il microrganismo può essere rinvenibile in molti alimenti, come il latte, il formaggio, la lattuga e i prodotti a base di carne (Martin *et Fisher*, 1999).

Gli insilati sono una fonte importante di *L. monocytogenes*, spesso correlata a focolai di listeriosi nei ruminanti. La sua persistenza è strettamente legata al pH di questo mangime: insilati con valori di pH compresi tra 5 e 6 unità o superiori mostrano un rischio molto maggiore di supportare la crescita del

microrganismo rispetto a quelli che presentano $\text{pH} < 5$. Tra l'altro nei ruminanti *Listeria monocytogenes* sostiene infezioni alla mammella, e pertanto è rinvenibile nel latte crudo, latte pastorizzato e formaggio naturalmente contaminati. In aggiunta esiste nell'uomo lo stato di portatore intestinale asintomatico (quindi sano) con prevalenze del 1-5% sull'intera popolazione (Martin *et* Fisher, 1999).

Il fattore di rischio maggiore per l'industria alimentare nei confronti del pericolo *L. monocytogenes* è rappresentato comunque dalla sua persistenza, dopo colonizzazione, negli ambienti di lavorazione (Martin *et* Fisher, 1999). L'ingresso di *L. monocytogenes* nell'industria alimentare avviene attraverso varie vie: gli animali che eliminano il microrganismo o lo veicolano sulla loro superficie cutanea; gli alimenti di origine animale crudi; il terriccio presente sulle scarpe e sugli abiti degli operatori; il trasporto delle attrezzature e dei vegetali crudi. Il batterio può inoltre sopravvivere sulle unghie del personale anche dopo il lavaggio delle mani e nell'aerosol. Poiché la crescita è favorita dall'alta umidità e dalla presenza di sostanza organica, *L. monocytogenes* è spesso riscontrabile in aree bagnate degli impianti, come le superfici di scolo o di drenaggio, nei luoghi dove si forma condensa e ristagna l'acqua, sui pavimenti e sulle attrezzature dei locali di lavorazione. Vista la capacità di formare biofilm, *L. monocytogenes* può aderire tenacemente a vari tipi di superfici, incluso l'acciaio inossidabile, il vetro e la gomma. Nei macelli le aree di lavoro

maggiormente contaminate sono solitamente la zona di stordimento e di appendimento dei suini. Tuttavia non è da escludere la sua presenza anche in aree ritenute “pulite” e sulle mani degli operatori. Queste considerazioni pertanto dimostrano l’importanza delle fasi di lavorazione nel causare episodi di cross-contaminazione. Per tutte queste sue caratteristiche l’eliminazione dagli ambienti di *L. monocytogenes* risulta oltremodo difficile. La capacità di aderire alle superfici a contatto con gli alimenti e di formare biofilm rendono difficoltosa l’implementazione di efficaci procedure di sanificazione soprattutto degli ambienti umidi e refrigerati, che presentano le condizioni ideali per il microrganismo, e innalzano il rischio di reintroduzione di *L. monocytogenes* durante le varie fasi di lavorazione, che costituisce uno dei punti più critici nel controllo di questo microrganismo (Fabbi *et al.*, 2005).

Gli alimenti più a rischio sono quelli lavorati e pronti al consumo. Questi alimenti, anche se conservati allo stato refrigerato, offrono un ambiente appropriato per la moltiplicazione di *L. monocytogenes* durante le fasi di lavorazione, trasporto e conservazione. In questa categoria rientrano il latte non pastorizzato e i suoi derivati, i formaggi molli, le carni lavorate, i prodotti a base di carne di pollame ed alcuni prodotti della pesca (Fabbi *et al.*, 2005).

Il latte crudo è stato spesso fonte di epidemie di listeriosi e l’origine di tale contaminazione è dovuta prevalentemente alla presenza di materiale fecale

negli ambienti dove il latte viene raccolto. È dimostrato che le cellule batteriche sospese nel latte sono inattivate dalla pastorizzazione ad alta temperatura (HTST, High Temperature Short Time; $\geq 72^{\circ}\text{C}$ per almeno 15 secondi). Infatti la pastorizzazione è da considerarsi un processo sicuro che riduce il numero di *L. monocytogenes* a livelli che non costituiscono un rischio apprezzabile per la salute umana. Risulta invece ad alto rischio il latte che ha subito una contaminazione successiva al trattamento termico, vista anche l'assenza della flora batterica competitiva che ne ostacola la crescita. *L. monocytogenes* incrementa nel latte di 10 volte in 7 giorni a 4°C ed inoltre si moltiplica più rapidamente nel latte pastorizzato rispetto al latte crudo incubato a 7°C . Quindi un latte contaminatosi dopo la pastorizzazione e conservato refrigerato può ospitare una popolazione di *Listeria* molto elevata già dopo una settimana. D'altra parte il microrganismo può sopravvivere al processo di lavorazione e maturazione del formaggio, a causa della resistenza alle fluttuazioni di temperatura, alla capacità di crescita alle temperature di refrigerazione e alla tolleranza alla presenza di alte concentrazioni saline. Lo sviluppo nel latte destinato alla caseificazione è ritardato, ma non completamente inibito, dall'aggiunta di colture starter di batteri lattici. Inoltre il batterio tende a concentrarsi nella cagliata rispetto al siero durante il processo di produzione del formaggio. Pertanto, il consumo di formaggi a pasta molle da parte di persone suscettibili è un fattore di rischio importante, visto anche la breve durata

del processo di maturazione del formaggio. In certi tipi di formaggi, ad esempio molli, erborinati e con muffa in superficie, è possibile riscontrare una carica molto elevata, pari a 10^5 - 10^7 UFC/g, dovuta a condizioni favorevoli, come l'innalzamento del pH, durante i processi di maturazione (Fabbi *et al.*, 2005).

La presenza di *L. monocytogenes* nelle carni in genere dipende dalla specie animale di provenienza, dal pH, dal tipo e dal numero di batteri della flora competitiva. Per questi motivi, la carne di pollo consente la crescita del microrganismo meglio di altre carni, visti i maggiori valori di pH e acqua libera che la contraddistinguono. Per quanto riguarda il suino, si può dire che gli animali possono albergare *L. monocytogenes* nelle tonsille. Inoltre, il microrganismo tende a concentrarsi in organi come il rene, i linfonodi mesenterici e mammari, il fegato, la milza. Pertanto costituisce un rischio per la salute umana sia il consumo di questi organi, che le procedure ispettive *post-mortem* al macello, visto che prevedono l'incisione e la palpazione di questi. Qualora dovesse verificarsi un episodio di cross-contaminazione infatti è importante ricordare che *L. monocytogenes* aderisce strettamente alla superficie della carne, rendendola un importante veicolo di contaminazione per gli ambienti di lavorazione, oltre che un rischio serio per la salute del consumatore. Tuttavia il livello di contaminazione delle carni crude e dei prodotti a base di carne è generalmente basso, inferiore a 100 UFC/g (Fabbi *et al.*, 2005).

L'epidemiologia delle infezioni a trasmissione alimentare

Secondo i dati emanati dall'EFSA, a livello europeo i casi di listeriosi umana nel 2009 sono aumentati rispetto agli anni precedenti. La fascia di età maggiormente colpita è stata quella senile, con un'elevata percentuale di casi fatali (16,6%). Tuttavia nei prodotti ready-to-eat (RTE), la prevalenza di *L. monocytogenes* in quantità superiori ai livelli previsti (100 UFC/g) dalla normativa vigente è stata riscontrata in un ridotto numero di campioni (EFSA e ECDC, 2011).

Nell'anno 2009, dagli Stati Membri sono stati riportati 1.645 casi umani confermati di listeriosi, con un aumento di 264 casi (19%) rispetto al 2008. Il tasso di notifica dell'intera Unione Europea è stato di 0,4 casi /100.000 abitanti, con le prevalenze più alte segnalate in Danimarca e Spagna (1,8 e 1,1 rispettivamente). I tassi di notifica relativi all'anno 2009 sono aumentati nuovamente dopo due anni di diminuzione, come riportato nella Figura 12 (EFSA e ECDC, 2011).

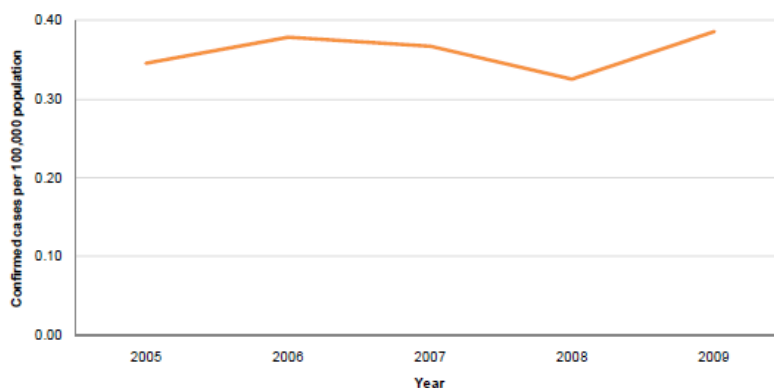


Figura 12: tassi di notifica di casi confermati di Listeriosi umana segnalati nell'Unione Europea negli anni 2005-2009 (EFSA e ECDC, 2011).

La distribuzione secondo le fasce di età dei casi di listeriosi nel 2009 è stata simile a quella osservata negli anni precedenti. Il tasso di notifica più elevato si è osservato nella fascia di età superiore ai 65 anni (1,1 casi/100.000 abitanti), interessando il 58,5% di tutti i casi segnalati. Solo il 4,2% dei casi di malattia è stato riscontrato nella fascia tra 0-4 anni, anche se la maggior parte di questi (88,5%) erano neonati, quindi di età inferiore ad un anno di età. È stato possibile stabilire la via di trasmissione per 71 casi (4,3%) confermati. Sessanta di questi sono stati causati da alimenti contaminati e nove erano legati allo stato di gravidanza. In un caso è avvenuta la trasmissione inter-umana da persona a persona e in un altro si è ipotizzata una diversa via di trasmissione. Tra i casi riconducibili al consumo di alimenti (60), il formaggio è stato il veicolo più frequente, seguito dal latte (EFSA e ECDC, 2011).

I prodotti RTE, prelevati nella fase di produzione negli stabilimenti di lavorazione, che hanno mostrato il livello più alto di non conformità ai

criteri di sicurezza alimentare del Reg. (CE) n. 2073/2005 (<100 UFC/g), sono stati quelli carnei (6,7%), seguiti da quelli a base di pesce (6,6%). I prodotti derivati dal latte e i formaggi hanno avuto percentuali di non conformità nettamente inferiori (Figura 13) comprese tra lo 0% e lo 0,2% (EFSA e ECDC, 2011).

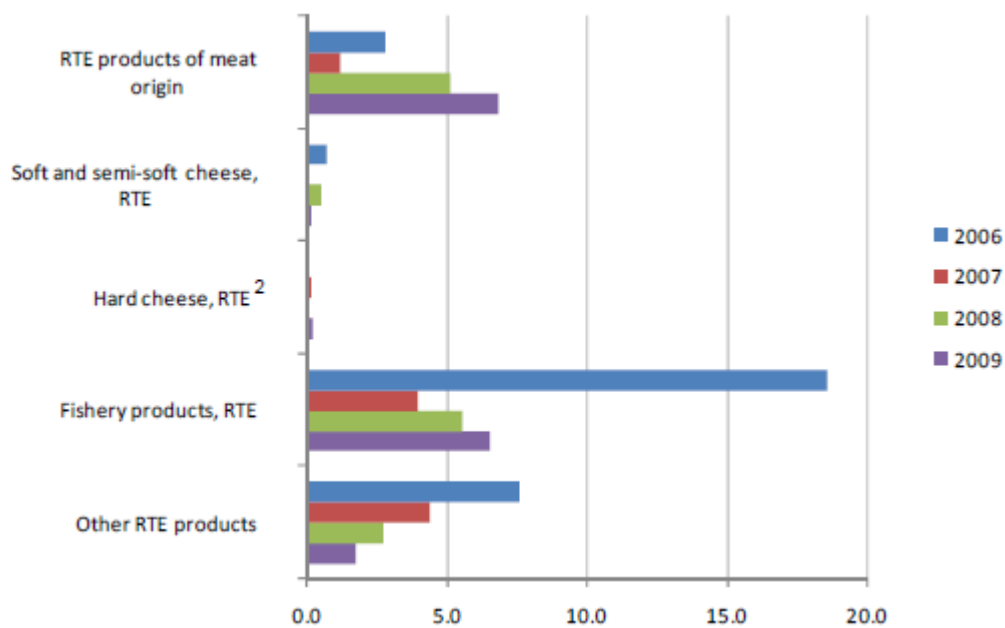


Figura 13: percentuali di non conformità al Reg. n. 2073 del 2005 relativamente al criterio *L. monocytogenes* nei prodotti RTE a livello di produzione negli anni 2006-2009 (EFSA e ECDC, 2011).

I parametri microbiologici d'igiene

In natura sono presenti molti generi batterici, ma solo relativamente pochi si rinvencono negli alimenti. Essi sono rappresentati dai microrganismi solitamente presenti nelle materie prime, che costituiscono la nicchia ecologica preferenziale, e da quelli che penetrano nell'alimento, provenendo dall'ambiente esterno nel corso delle diverse operazioni di trasformazione della materia prima fino al prodotto finale. La presenza quantitativa di un determinato microrganismo dipende dalle condizioni intrinseche, di composizione, ed estrinseche, ambientali o tecnologiche, che caratterizzano il singolo alimento. Vi sono pertanto microrganismi, indicati come flora microbica di "associazione", la cui presenza è del tutto fisiologica in definite classi di prodotti alimentari e che, purché presenti in quantità non eccessive, delineano una situazione di normale colonizzazione della matrice alimentare. Le carni fresche sono costituite dalla parte muscolare dell'animale sano che, sterile fino al momento della macellazione e del sezionamento, viene in queste fasi contaminata in superficie da microrganismi provenienti dalla cute, dal tratto gastrointestinale dell'animale, nonché dal contatto con le attrezzature e gli utensili. L'originale flora, inizialmente costituita da batteri mesofili (micrococchi, enterococchi, lattobacilli, enterobatteri) durante la conservazione a temperature di refrigerazione viene affiancata, e talvolta

sostituita, da una flora psicrotrofa (*Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Proteus* e *Alcaligenes* soprattutto). Quindi, sebbene sia fisiologica, la presenza numerica della flora di associazione risulta essere contenuta dalla scrupolosa applicazione delle GMP e delle GHP a tutti i livelli della catena alimentare. L'effetto di tali cautele, unitamente all'adozione delle modalità di controllo delle operazioni tecnologiche critiche in osservanza del sistema HACCP, risulta essere benefico anche per la riduzione del rischio di presenza di batteri patogeni. Le carenze rilevanti nel rispetto delle basilari regole igieniche o una perdita di controllo delle variabili critiche dei processi di trasformazione o conservazione producono effetti indesiderati sul contenuto microbico degli alimenti. Si possono infatti verificare un incremento incontrollato o una sopravvivenza indesiderata della flora batterica originaria, oltre che un ingresso di microrganismi dall'esterno. Tale incremento può giungere a livelli tali da conferire modificazioni di aspetto indesiderabili, come colore, odore, consistenza anomali, che rendono l'alimento non più commestibile (Ottaviani *et* Ottaviani, 2005).

Per essere considerati degli accettabili indicatori microbici di deterioramento o indici di scarsa igiene del processo produttivo, le classi di batteri devono essere dotate di alcune caratteristiche basilari. In primo luogo devono essere presenti in quantità contenuta, o assenti, nelle materie prime o nei prodotti trasformati, lavorati nel pieno rispetto delle corrette regole igieniche. In secondo luogo, devono indicare chiaramente, con la

loro presenza o con cariche in quantità significativamente più elevate del normale, un deterioramento incipiente, non percepibile con la mera analisi organolettica, originato dal mancato rispetto delle GHP. Infine, eventualmente dovrebbero rendere possibile una distinzione tra le anomalie originate dalla materia prima non idonea e perdite di controllo legate alle condizioni di lavorazione (Ottaviani *et* Ottaviani, 2005).

L'analisi matematica della distribuzione numerica del marcatore prescelto porta ad individuare un valore, denominato "m", che rappresenta il 95° percentile della curva di distribuzione e fissa il massimo contenuto microbico che si riscontra nell'ideale condizione di assoluto rispetto di tutte le regole produttive e di igiene. Tuttavia possono verificarsi deviazioni transitorie ed accidentali dovute ad inconvenienti meccanici o di altro tipo, che generano fluttuazioni delle cariche batteriche verso l'alto. Queste sono tollerate se rimangono all'interno di un valore limite definito "M", oltre al quale la deviazione è da ritenersi indicativa di una grave deficienza produttiva o di altro tipo. Parimenti inaccettabile, nella logica delle tre classi di giudizio che si vengono così a creare (inferiore a m; compreso tra m e M; superiore ad M), l'eccessiva incidenza (indicata con lettera "c") dei campioni di qualità microbiologica marginale (compresi tra m e M) sottolinea una deriva, bensì non grave, non più accidentale ma sistematica, che richiede correzioni alle condizioni di igiene produttiva (Ottaviani *et* Ottaviani, 2005).

Un consolidato indicatore di deterioramento batterico aspecifico è la carica batterica totale nelle carni fresche. In realtà con tale parametro non si misura tutta la flora microbica presente in un alimento, ma unicamente quella parte, pur rilevante, che è capace di formare colonie visibili sul terreno di coltura agar triptone glucosio con estratto di lievito (PCA, Plate Count Agar), incubato a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 72 ore ± 2 ore. Cariche comprese nel limite di 5 unità logaritmiche (10^5) UFC/cm² sulla superficie della carne sono associate ad una sostanziale accettabilità e stabilità organolettica. Per valori superiori è lecito supporre un deterioramento incipiente, spesso associato a cariche psicrotrofiche superficiali molto elevate, contraddistinte dalla liberazione di metaboliti maleodoranti. Tuttavia la carica batterica totale, tra gli indicatori microbici, è caratterizzata da un alto valore inferente e risulta di difficile impiego nel controllo microbiologico degli alimenti, in quanto non permette di identificare il punto lungo la catena produttiva in cui si è verificata l'anomalia che ha causato l'incremento batterico. Pertanto la presenza di una flora batterica in quantità rilevante deve essere considerata con cautela come criterio di giudizio circa le condizioni igieniche di svolgimento delle attività (Ottaviani *et* Ottaviani, 2005).

Altri indicatori, in virtù del loro peculiare comportamento, risultano valide “spie” di perdita di controllo in momenti ben definiti del ciclo alimentare: questo è il caso delle Enterobacteriaceae. La famiglia include generi e

specie di prevalente origine fecale (*Escherichia*, *Moellerella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), e a prevalente localizzazione ambientale o mista. Gli appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae possono avere un ruolo fondamentale nel deperimento della carne. Questa categoria infatti utilizza prevalentemente il glucosio e il glucosio 6-fosfato come principale fonte carboniosa. Quando questi substrati di crescita si esauriscono, avviene la degradazione degli amminoacidi, con la produzione di ammoniaca, composti volatili contenenti zolfo e ammine della putrefazione. Anche in questo caso tuttavia è ingiustificata un'equivalenza tra conteggi elevati di Enterobacteriaceae e l'esistenza di un pericolo per la salute. Infatti, anche se la famiglia include i più importanti patogeni intestinali, quali *Salmonella*, *Yersinia*, ceppi patogeni di *E. coli* e *Shigella*, molte specie hanno invece un'origine puramente ambientale e sono prive di potere patogeno per l'uomo (Ottaviani *et* Ottaviani, 2005).

Monitoraggio delle temperature di raffreddamento post-macellazione attraverso l'impiego della tecnologia IR e valutazione di parametri microbiologici igienico-sanitari

- PARTE SPERIMENTALE -

Scopo della ricerca

Il presente lavoro di tesi si è posto il fine di valutare in che misura le temperature superficiali delle carcasse suine, rilevate al termine della macellazione, influiscano sulla proliferazione dei microrganismi, evidenziando eventuali fattori di rischio specifici. La temperatura infatti riveste un ruolo molto importante nel controllo dei rischi microbiologici, tanto che il suo monitoraggio è incluso nei piani di autocontrollo dei macelli. Le carcasse suine durante il processo di macellazione sono esposte a vari trattamenti termici, quali la scottatura nelle vasche di acqua a 61-62°C per facilitare la depilazione e la flambatura per la rimozione delle setole residue. Tuttavia ci potrebbe essere una distribuzione non omogenea del calore durante queste fasi, che associata ad un raffreddamento difforme dei vari punti della carcassa (per fattori intrinseci alla conformazione dell'animale), potrebbe condizionare la presenza di aree superficiali maggiormente suscettibili alla proliferazione microbica rispetto ad altre. Grazie a tecnologie particolari di misurazione del calore basate sull'emissione dei raggi infrarossi, è possibile rilevare istantaneamente la temperatura in ogni punto della carcassa. La metodica è impiegata anche per monitorare la cinetica di raffreddamento *post-mortem* durante la permanenza nelle celle frigorifere nelle 24 ore successive al termine della macellazione, oltre che l'umidità relativa dei relativi locali, con l'impiego

di sonde miniaturizzate a lettura remota inserite direttamente in profondità nella parte muscolare. I dati così ottenuti relativi a difformità nel corso del processo di raffreddamento (dovuti a punti di particolare inerzia termica), incrociati con i risultati delle analisi microbiologiche, effettuate sulla carcassa stessa, relative ai principali parametri microbiologici indicatori di igiene del processo di lavorazione e di maggiore rilevanza per la salute pubblica, sono utili per evidenziare particolari criticità.

D'altra parte il campionamento eseguito in diversi punti della carcassa suina consente di saggiare il livello di contaminazione specifico delle diverse aree considerate, mettendo in luce peraltro quelle che maggiormente sono esposte al rischio di contaminazione a seguito del processo produttivo. Per questo motivo, in accordo con gli indicatori microbiologici individuati dall'EFSA per valutare le performances della macellazione suina (EFSA 2011a) già trattati nel capitolo su *Salmonella* spp., il campionamento microbiologico deve essere effettuato al termine della macellazione (ma prima del raffreddamento) e poi ripetuto al termine della refrigerazione, in modo da quantificare l'impatto delle operazioni successive alla macellazione (sezionamento e permanenza nelle celle frigorifere) come differenza tra i due risultati.

In ultima analisi si vuole pertanto valutare se, nel determinare il livello di contaminazione complessiva della carne fresca, incida maggiormente la temperatura o se al contrario abbia una maggior influenza

l'applicazione delle pratiche igieniche e di lavorazione messe in atto dagli operatori addetti.

Materiali e Metodi

Le operazioni di campionamento hanno avuto luogo in otto sedute successive in un macello di suini di dimensioni medio - grandi sito in provincia di Mantova, in un arco di tempo compreso Febbraio e Giugno 2010. Il numero totale di carcasse campionate è stato pari a 15, due per ogni sessione, tranne durante la prima visita nella quale è stata campionata una sola carcassa. I siti sottoposti a campionamento per le analisi microbiologiche sono stati selezionati in accordo con la Decisione n. 471 del 2001: gola, addome, lombi e coscia. Il campionamento per i parametri microbiologici è stato effettuato dopo la macellazione, ma prima della refrigerazione (come previsto dal Reg. 2073/2005 e successive modifiche), ed è stato ripetuto sulla coscia a distanza di 24 ore, dopo che quest'ultima aveva raggiunto una temperatura interna inferiore a 4°C. Allo scopo si è utilizzato un metodo di campionamento non distruttivo con l'impiego di spugne abrasive, "sponge-bags" (TWIRL'EM®). I tamponi eseguiti sui singoli siti non sono stati aggregati per ciascuna carcassa, ma sono stati analizzati separatamente per la numerazione dei microrganismi a 30°C, la numerazione delle Enterobacteriaceae, la ricerca di *Salmonella* spp. e di *Listeria monocytogenes*. Per ogni sito, sono stati effettuati due tamponi superficiali separati, eseguiti in modo consequenziale, uno da sottoporre ai

metodi di analisi quantitativi e l'altro per la ricerca dei microrganismi patogeni.

Le procedure di campionamento sono state effettuate secondo le norme ISO 7218:2005 e ISO 17604:2003. L'attrezzatura necessaria al campionamento superficiale delle carcasse è stata predisposta sul tavolo da lavoro. Prima di effettuare le operazioni di campionamento, le mani sono state lavate, disinfettate e asciugate con carta a perdere, prestando attenzione a non toccare la superficie esterna dei guanti nell'atto di infilarli. Le maniche del camice e gli indumenti sono stati fissati per non poter entrare in contatto, al momento del prelievo e della preparazione del campione, con le superfici o con le attrezzature sterili.

Le spugne impiegate sono state preparate aggiungendo al sacchetto plastico tipo Stomacher una quantità di soluzione salina sterile pari a 10 ml, quantità sufficiente per inumidire la spugna senza che rimangano eccessi di liquido visibili nel fondo del sacchetto: BPW (acqua peptonata e tamponata) per la ricerca di *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, SOLP (soluzione peptone – sale) per la numerazione dei microrganismi a 30°C e la numerazione delle Enterobacteriaceae, in accordo con la norma UNI EN ISO 6887-1:2000. La spugna è stata successivamente massaggiata dall'esterno con adeguati movimenti per essere certi che la stessa venisse uniformemente inumidita. Quindi è stata spinta, sempre esercitando pressione dall'esterno, verso l'apertura del sacchetto prima di aprire la

busta di plastica. Nell'estrarre la spugna è stata posta attenzione al fatto che non entrasse in contatto con le superfici esterne. Questa operazione è stata effettuata solo al momento del prelievo e la spugna è stata sempre manipolata attraverso il sacchetto di plastica, senza mai entrarne in contatto direttamente, per ridurre al minimo la possibilità di contaminazioni esogene.

Dopo aver identificato i siti da campionare, si è proceduto a delimitare l'area di 100 cm² da sottoporre a prelievo mediante l'impiego di una maschera metallica che delimitasse un'area quadrata di 10 cm di lato. È stata esercitata una pressione sufficiente a causare la procidenza del muscolo sottostante. Allo scopo è stato utilizzato un delimitatore metallico sterilizzabile nelle apposite coltelliere a 82°C. L'area compresa nel perimetro interno del delimitatore non è venuta in contatto con le mani dell'operatore né con alcun altro materiale diverso dalla "sponge". La spugna è stata strofinata esercitando una buona pressione, come quella che si applica per detergere la superficie della carcassa dai residui di sangue secco, sia in senso orizzontale che in verticale, per circa 10 secondi per verso, terminando in senso obliquo. Particolare attenzione è stata rivolta a non strofinare la spugna al di fuori dell'area circoscritta. In successione, le spugne sono state strofinate su tutti i siti, a partire da quello meno contaminato, fino a quello che si è ritenuto maggiormente contaminato. In linea di massima si è proceduto dall'alto verso il basso della carcassa,

passando dal quarto posteriore a quello anteriore, avvalendosi dell'aiuto di una scala. È stata impiegata una spugna diversa per ognuno dei quattro siti da sottoporre a campionamento, sia per ogni carcassa, sia per ogni categoria di analisi da effettuare. In definitiva, per ogni sito di campionamento si sono utilizzate due spugne, una per le analisi quantitative (colonie aerobiche a 30°C ed Enterobacteriaceae), e una per le analisi qualitative (*Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*). Durante tali operazioni di prelievo un assistente ha aiutato nel contenimento della mezzena, facendo attenzione a non entrare in contatto, direttamente o indirettamente, con le aree soggette a campionamento. Compilate queste attività, le spugne sono state riposte nelle buste sterili di plastica, aggiungendo la rimanente soluzione peptonata tamponata sterile (15ml) per raggiungere il valore complessivo di 25 ml. I sacchetti sono stati così sigillati e predisposti per l'invio al laboratorio, dopo aver proceduto alla corretta identificazione. A tal fine le carcasse sono state numerate in progressione e ad ognuno dei quattro siti sottoposti al campionamento è stata abbinata una lettera: A per l'addome, L per i lombi, C per la coscia e G per la gola. L'identificazione finale ed univoca del campione è stata ottenuta abbinando il numero della carcassa alla lettera specifica del sito esaminato. Dato che il campionamento sulla coscia è stato effettuato anche a distanza di 24 ore dalla macellazione, dopo stoccaggio nelle celle

frigorifere, al numero progressivo della carcassa di origine e alla lettera C è stata aggiunta la dicitura T₊₂₄.

I campioni sono stati analizzati nel più breve tempo possibile dal momento del prelievo e comunque mai oltre le 24 ore. Per il trasporto al laboratorio della Sezione di Ispezione degli Alimenti di origine animale della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma, i campioni sono stati refrigerati ad una temperatura compresa tra 0°C e 4°C e non congelati. Si è evitato quindi di mettere i campioni a diretto contatto con le piastre eutettiche congelate, impiegate all'interno dei frigoriferi portatili per mantenere bassa la temperatura durante il trasporto.

In totale sono stati testati 75 aree differenti appartenenti a 15 carcasse suine, dato che la coscia è stata testata sia subito dopo la macellazione e a distanza di 24 ore. Ad ogni spugna è stato aggiunto un quantitativo pari a 90 ml di soluzione sterile specifica per ogni parametro analizzato per ottenere il rapporto di 100 ml per 100 cm² nella sospensione iniziale del campione, come specificato dalla norma ISO 18593:2004. La sospensione è stata sottoposta ad un'omogenizzazione peristaltica per almeno 1 minuto in Stomacher.

Per l'allestimento delle diluizioni seriali per l'esecuzione delle analisi quantitative (numerazione dei microrganismi a 30°C ed Enterobacteriaceae), si è seguita la norma UNI EN ISO 6887-1:2000. A

partire dalla “soluzione madre” (sospensione iniziale 1:10) sono state ottenute le diluizioni decimali seriali successive trasferendo 1 ml di campione in 9 ml di soluzione peptone – sale. Nell’effettuare le operazioni sono stati rispettati i tempi di 45 minuti tra il termine delle preparazione della sospensione iniziale ed il momento in cui l’inoculo è venuto in contatto col terreno colturale, e di 30 minuti tra la preparazione della sospensione iniziale e l’inizio della preparazione delle successive diluizioni.

Per la conta dei microrganismi a 30°C si è fatto riferimento al metodo ISO 4833:2003, il cui diagramma di flusso è riportato in Figura 14. Si è trasferito, in ciascuna di due piastre Petri da 90 mm di diametro, 1 ml del campione di prova e delle diluizioni successive. In seguito, si sono versati 12-15 ml di Plate Count Agar (PCA; Oxoid codice CM0325) per ciascuna piastra, preventivamente raffreddato a 44°C - 47°C. L’inoculo è stato miscelato accuratamente con il terreno, ruotando le piastre, e la miscela è stata fatta solidificare su una superficie fresca ed orizzontale. Infine le piastre sono state invertite e poste ad incubare a 30°C ± 1°C per 72 ore ± 3ore. Al termine di questo periodo, sono state contate tutte le colonie cresciute senza discriminazione di forma e dimensione. Le colonie diffuse sono state considerate come colonie singole. La diluizione con le piastre con un numero di colonie compreso tra 10 e 300 è stata selezionata come la prima diluizione utile ai fini del conteggio, considerando anche la

diluizione successiva. I calcoli sono stati effettuati per determinare il numero di colonie espresso in cm^2 (essendoci l'equivalenza con ml). Per esiti inferiori a 10 UFC/ cm^2 il risultato viene espresso nel modo seguente, in accordo con la norma ISO 7218:2007:

- da 1 a 4: microrganismi presenti $<40 \text{ UFC/ cm}^2$ seguito dal termine stimato.
- da 4 (compreso) a 10 (escluso): risultato “stimato” espresso come numero di UFC/cm^2 pari al numero di colonie.

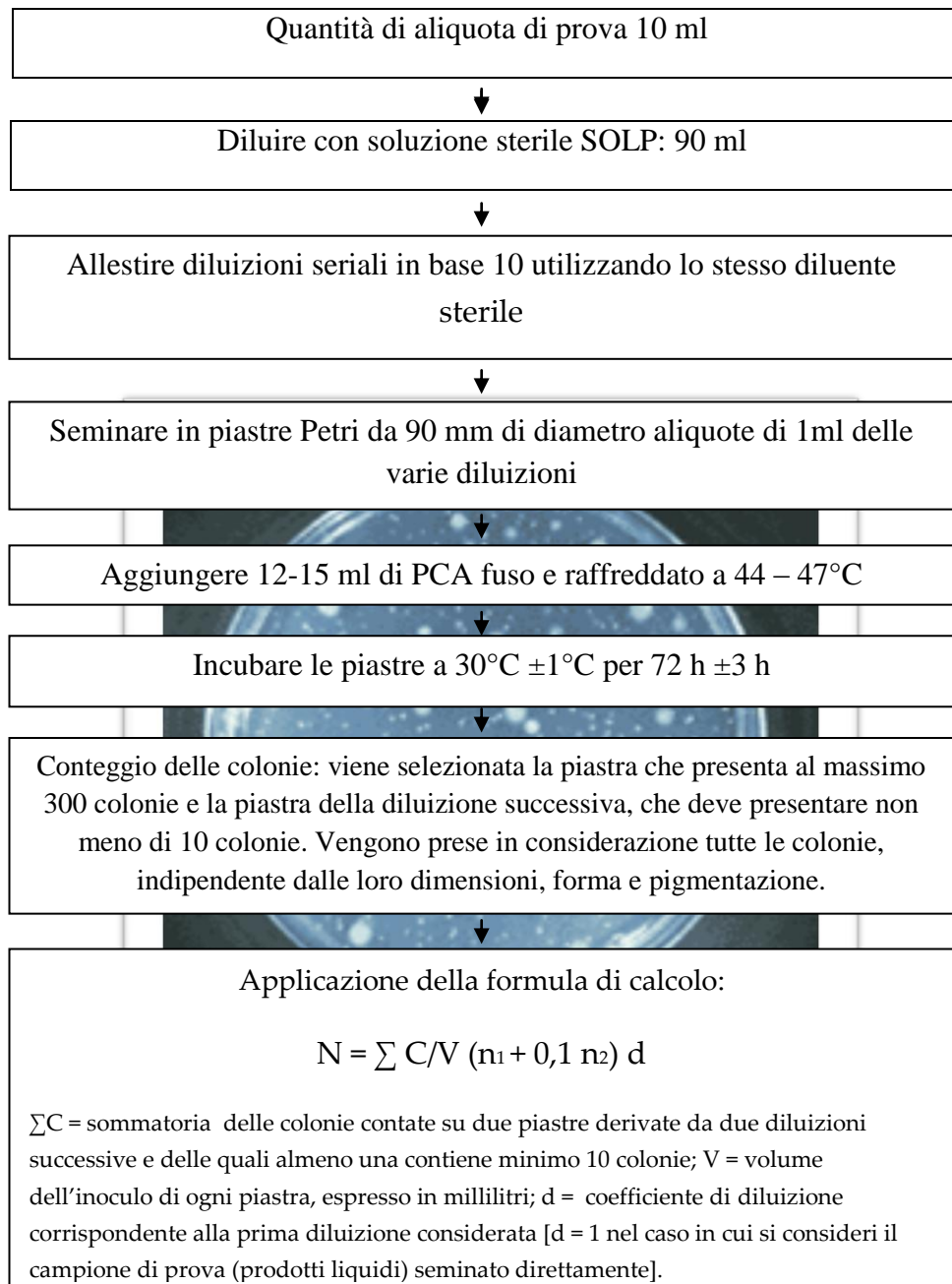


Figura 14: diagramma di flusso per l'esecuzione della Numerazione delle colonie aerobiche a 30°C (ISO 4833:2003).

Per la numerazione delle Enterobacteriaceae si è seguita la norma ISO 21528-2:2004 e il diagramma di flusso è riportato in Figura 15. Analogamente alla conta dei microrganismi a 30°C, si è trasferito in ciascuna delle due piastre Petri da 90 mm di diametro, 1 ml del campione di prova e delle diluizioni successive. In ciascuna piastra si sono versati 12 ml di Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA; Biolife codice Ref.4021882) surriscaldato a temperatura di ebollizione, ma non sterilizzato a 121°C, e quindi raffreddato a 44°C – 47°C nell'apposito bagno termostatico. L'inoculo è stato miscelato accuratamente con il terreno ruotando le piastre e la miscela è stata fatta solidificare su una superficie fresca ed orizzontale. Dopo la completa solidificazione della miscela, è stato aggiunto uno strato di copertura di 15 ml di VRBGA, per prevenire la crescita diffusiva e per ottenere condizioni di crescita semi-anaerobiche. Una volta avvenuta la solidificazione completa, le piastre sono state invertite ed incubate a 37°C per 24 ore ± 2 ore.

Trascorso il periodo di incubazione sono state contate le colonie rosa o rosso-porpora, con o senza l'alone di precipitazione. È stata selezionata la diluizione nelle cui piastre era contenuto un numero di colonie caratteristiche inferiore o uguale a 150 (e massimo 300 colonie totali) e la diluizione successiva. Tuttavia, se più di metà della piastra è occupata da colonie diffuse, l'analisi è da ritenersi nulla; in caso contrario si fa una proporzione con la restante parte contabile.

Da ciascuna piastra selezionata, sono state scelte casualmente 5 colonie caratteristiche, che sono state sotto-colturate su Triptone Soya Agar (TSA; Oxoid codice CM0131) con estratto di lievito (YE; Oxoid codice LP0021) per l'esecuzione dei test di conferma biochimici. Questi sono rappresentati dalla reazione all'ossidasi e dal test di fermentazione del glucosio. Per testare la presenza dell'enzima citocromo ossidasi, sono stati utilizzati dischetti commerciali (Bios Discs O; Biolife codice Ref. 191040), contenenti il reattivo N,N,N,N-tetrametil-1,4-fenilendiamina. La prova è stata ritenuta negativa quando il dischetto non virava ad un colore violaceo entro 10 secondi, evitando di utilizzare anse contenenti nichel e cromo. Il test di fermentazione del glucosio è stato effettuato utilizzando un terreno liquido nutritivo contenente rosso fenolo (Biolife, codice Ref. 4019102) come indicatore, al quale è stato aggiunto il glucosio (Carlo Erba) ad una concentrazione dell'1%. Il brodo nutritivo ottenuto non è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 15 minuti, ma è stato filtrato a freddo per l'eliminazione dei microrganismi contaminanti (soprattutto lieviti e muffe). Le colonie da confermare sono quindi state seminate in provette contenenti questo brodo colturale ed incubate per 24 ore \pm 2 ore a 37°C. Una colorazione giallastra dopo incubazione è stata considerata una reazione positiva alla fermentazione del glucosio, mentre la colorazione rossastra viene ritenuta negativa.

Sono state confermate come appartenenti alle Enterobacteriaceae le colonie che hanno dato una reazione positiva al test della fermentazione del glucosio e una reazione negativa al test dell'ossidasi. Sulla base della percentuale di conferma, ottenuta dalle 5 colonie testate da ogni piastra selezionata, si è alla fine proceduto a calcolare il numero di Unità Formanti Colonia (UFC) per ml (cm^2 di superficie sottoposta a campionamento). Per esiti inferiori a 10 UFC/ cm^2 il risultato viene espresso nel modo seguente, in accordo con la norma ISO 7218:2007:

- da 1 a 4: risultato espresso come <40 UFC/ cm^2 seguito dal termine stimato.
- da 4 (compreso) a 10 (escluso): risultato “stimato”, espresso come numero di UFC/ml pari al numero di colonie.

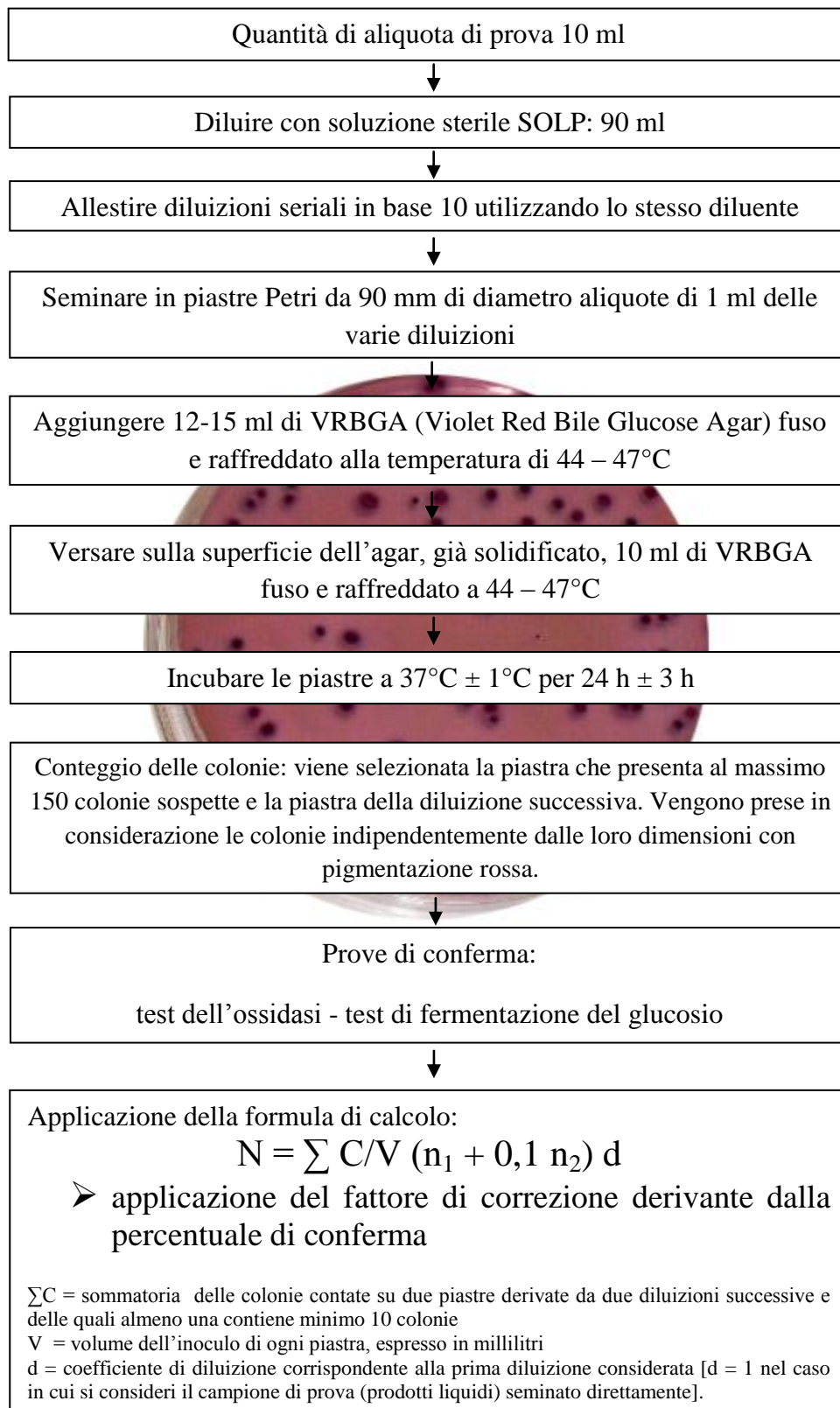


Figura 15: diagramma di flusso per l'esecuzione della Numerazione delle Enterobacteriaceae (ISO 21528-2:2004).

Per le analisi qualitative, in laboratorio si è proceduto alla suddivisione a metà delle spugne imbevute di BPW per permettere la fase di arricchimento per entrambi i microrganismi sottoposti a prova.

Per la ricerca di *Salmonella enterica* si è seguita una procedura d'analisi basata sulla norma UNI EN ISO 6579:2002/Amd 1:2007. I tamponi da analizzare sono stati sottoposti ad una fase di pre-arricchimento non selettivo, aggiungendo una quantità pari a 45 ml di Acqua Peptonata e Tamponata (BPW, Oxoid codice CM1049) alla metà della “sponge” reidratata con 5 ml di soluzione di trasporto. In tal modo si è raggiunta una proporzione di 1/10 rispetto al campione iniziale. La “Sponge” è stata incubata a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18 ore ± 2 ore.

La fase di arricchimento selettivo è stata effettuata ponendo un'aliquota di 0,1 ml di campione pre – arricchito in Rappaport-Vassiliadis Soya Broth (RSV broth, Oxoid codice CM0866) e 1 ml in Muller- Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth (MKTTn broth, Oxoid codice CM0343). Il brodo RVS ha come elemento selettivo il verde malachite, che conferisce la classica colorazione verde-blu al brodo. Grazie alla temperatura di incubazione di $41,5^{\circ}\text{C}$, viene effettuata anche una selezione termica negativa verso i microrganismi non appartenenti al genere *Salmonella*. Il brodo MKTT, invece, contiene lo iodio come elemento inibente altri microrganismi, in particolare nei confronti di *Proteus*. Le brodocolture,

dopo essere state incubate rispettivamente a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ore ± 3 ore, sono state seminate su terreni selettivo– differenziali agarizzati, per ottenere colonie isolate ben separate.

I terreni colturali utilizzati sono stati lo Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD agar, Oxoid CM0469) e il Brilliant Green Agar (BGA agar, Oxoid codice CM0263), come secondo terreno selettivo opzionale. Un'aliquota (circa 10 μl) di ciascun brodo selettivo è stata seminata su due piastre di terreno solido, insemenzandole in serie e utilizzando la stessa ansa, per un totale di otto piastre Petri per ogni campione analizzato. Dopo incubazione a 37°C per 24 ore ± 3 ore, le piastre sono state esaminate per verificare la presenza di colonie di *Salmonella* spp. tipiche o sospette (Figura 16).

Le colonie tipiche di *Salmonella* su XLD agar appaiono con il centro nero e il margine biancastro, su uno sfondo rossastro del terreno. Sono da ritenersi comunque sospette le colonie prive di centro nero o che portano a viraggio del terreno al giallo. L'aspetto tipico è dovuto al fatto che *Salmonella* produce idrogeno solforato, che viene evidenziato grazie al sistema rivelatore dell'ammonio citrato ferrico, che conferisce la classica colorazione nera lucida. Il fondo rosso invece è dovuto ad una parziale fermentazione degli zuccheri presenti nel terreno, dato che *Salmonella* utilizza solamente lo xilosio e non lattosio e saccarosio, e alla successiva utilizzazione di derivati proteici . che alcalinizzano il terreno. Le colonie

atipiche di *Salmonella* possono avere uno sfondo giallo per la fermentazione del lattosio, caratteristica di sierovarianti appartenenti a *Salmonella enterica* subsp. *arizona*. Il centro nero potrebbe non essere presente per i sierotipi di *Salmonella* Typhi, *S. Paratyphi* A, B e C.

Le colonie tipiche di *Salmonella* su BGA agar appaiono lisce e rossastre, con margine più o meno irregolare. La colorazione rossastra è dovuto ad una alcalinizzazione del terreno, dovuta alla mancata utilizzazione del lattosio e del saccarosio, e all'impiego dei soli substrati proteici come unica fonte energetica. Le colonie atipiche di *Salmonella* possono avere una colorazione gialla per la fermentazione del lattosio, caratteristica di sierovarianti appartenenti a *Salmonella enterica* subsp. *arizona*.

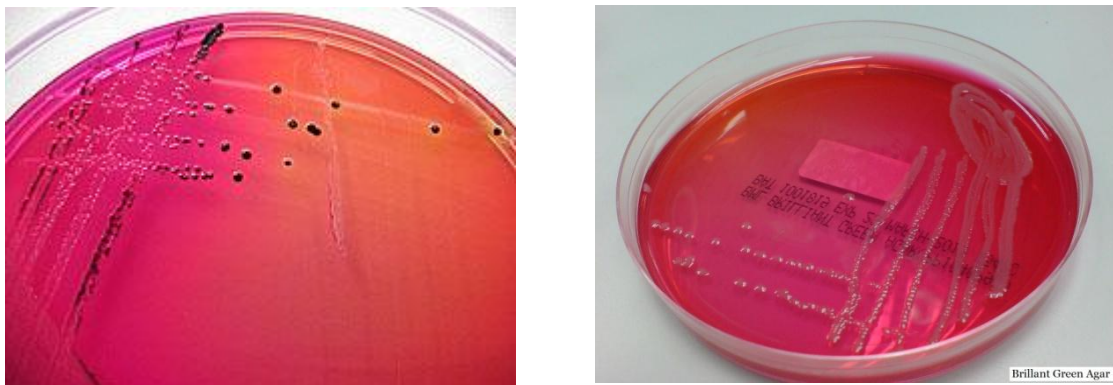


Figura 16: colonie tipiche di *Salmonella* spp. sul terreno XLD (sinistra) e BGA (destra).

Dalle due piastre di ciascun terreno selettivo impiegato, sono state selezionate come minimo 5 colonie sospette, che sono state sotto- colturate su TSYEA (TSA Oxoid codice CM 0131; YE Oxoid codice LP 0021) per

ottenere colture dalle quali eseguire le prove di conferma biochimiche e sierologiche.

Le prove di conferma biochimiche hanno visto l'impiego di Triple Sugar Iron agar (TSI, Oxoid codice CM0277), Lysine Iron Agar (LIA, Oxoid codice CM0381) e agar all'Urea di Christensen (Urea agar base, Oxoid codice CM0053; Urea supplement, Mast Diagnostic codice Ref.DM2285), disposti in provette a "becco di clarino" e seminati con la tecnica di ago – infissione, ad eccezione dell'agar all'Urea inoculato solo superficialmente.

Esecuzione delle prove di conferma biochimica in macrometodo: l'incubazione dei terreni differenziali avviene ad una temperatura di 37°C per 24 ore.

- TSI (Triple Sugar Iron agar) Figura 17: formazione di deposito nero; fondo giallo per l'acidificazione del terreno dovuta all'utilizzo di glucosio (ma non di lattosio e saccarosio) in ambiente anaerobio; slant rosso che indica che il microrganismo ha decarbossilato gli amminoacidi in presenza di ossigeno.

Avvertenza importante: tenere il tappo aperto per creare le condizioni idonee per le due camere, aerobia ed anaerobia.

- LIA (Lisine Iron Agar) Figura 18: formazione di deposito nero; fondo porpora per l'utilizzazione della lisina come fonte energetica alternativa al glucosio.

Avvertenza importante: tenere il tappo aperto per creare le condizioni idonee per le due camere, aerobia ed anaerobia.

- Agar all'urea di Christensen: mancato viraggio del terreno al fucsia per mancanza dell'enzima ureasi.

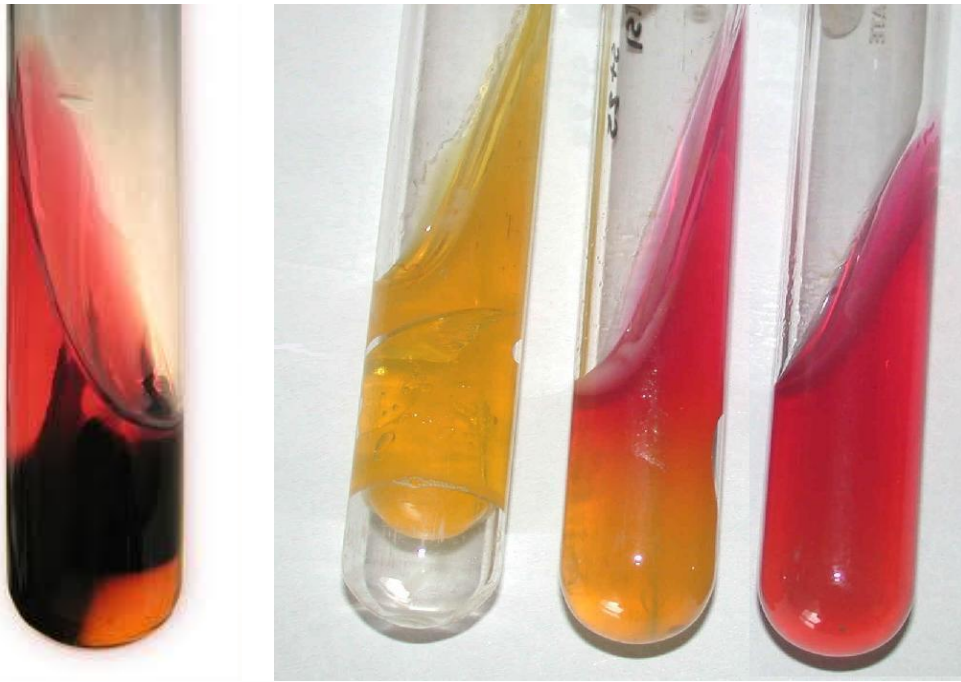


Figura 17: aspetto tipico di un ceppo di *Salmonella* spp. su TSI (sinistra) e reazioni atipiche (destra).

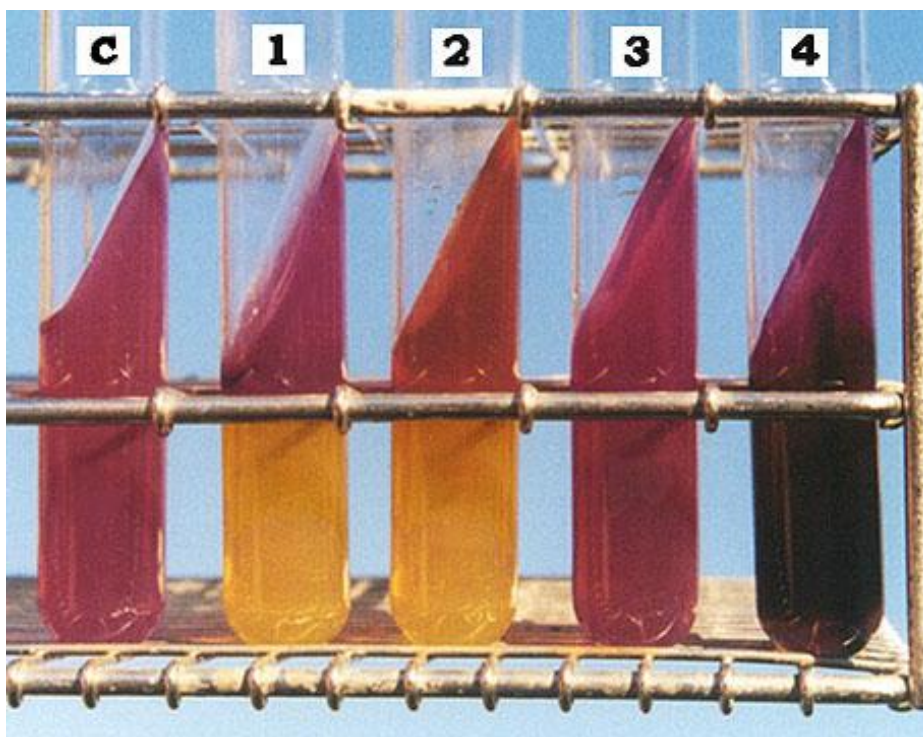


Figura 18: aspetto tipico di un ceppo di *Salmonella* spp. su LIA (provetta numero 4) e reazioni atipiche (provette restanti).

Le colonie che hanno mostrato la capacità di fermentare il glucosio, di impiegare la lisina come fonte carboniosa alternativa, di non disporre dell'enzima ureasi e di non utilizzare il saccarosio e il lattosio, sono state sottoposte a test biochimici aggiuntivi (presenza di β - galattosidasi, reazione di Voges- Proskauer e produzione di indolo), valutati con gallerie miniaturizzate API 20E® (Biomérieux, codice Ref.20100).

Le colonie con profilo compatibile con *Salmonella* spp., infine, sono state sottoposte a test sierologico. La prova è rappresentata da un'agglutinazione rapida su vetrino, utilizzando un anti-siero polivalente verso l'antigene O (Denka Seiken co. LTD, codice Ref. 292537). I ceppi, che hanno dato una reazione positiva al test, sono stati considerati appartenenti al genere *Salmonella*.

I ceppi isolati sono stati sottoposti ai test per determinare la suscettibilità agli antimicrobici, come prescritto dalla Direttiva CE n°99 del 2003. La prova è stata espletata secondo il metodo della disco-diffusione su piastra per gli appartenenti alle Enterobacteriaceae, in accordo con le disposizioni del Clinical and Laboratory Standards Institute, precedentemente noto come NCCLS. Sono stati utilizzati i seguenti antibiotici, seguiti dalle relative concentrazioni, visto il loro impiego nella pratica clinica: colisitina, 10 μ g; sulfametossazolo – trimethoprin, 23,75 μ g – 1,25 μ g; kanamicina, 30 μ g; gentamicina, 10 μ g; neomicina, 30 μ g; ceftazidime, 30 μ g; cefotaxime,

30µg; amoxicillina – acido clavulanico, 20µg - 10µg; acido nalidixico, 30µg; tetraciclina, 30µg; ampicillina, 10µg; streptomina, 10µg; sulfonamidi, 300µg; cloramfenicolo, 30µg; cefalotina, 30µg; enrofloxacina, 5µg; ciprofloxacina, 5µg. Per il test di antibiotico-resistenza è stato impiegato il terreno ISO-SENSITEST® Agar (Oxoid, codice CM0471) e dischi commerciali contenenti gli antibiotici citati (Oxoid). I risultati dei test di sensibilità agli antimicrobici sono stati categorizzati come sensibili, intermedi o resistenti, secondo i principi interpretativi guida del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI 2006; CLSI 2006a). Successivamente i risultati verso i singoli antibiotici sono stati dicotomizzati fondendo le categorie dei resistenti e degli intermedi, in accordo con il Comitato Europeo per i Test di Antibiotico Suscettibilità (EUCAST).

I ceppi riconosciuti appartenere a *Salmonella* spp. sono stati infine inviati all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, sezione di Brescia, per la tipizzazione sierologica, secondo lo schema di classificazione di Kauffmann-White e LeMinoir, basata sulla determinazione degli antigeni somatici e flagellari. Il diagramma di flusso della metodica analitica per la ricerca di *Salmonella* spp. è riassunto in Figura 19.

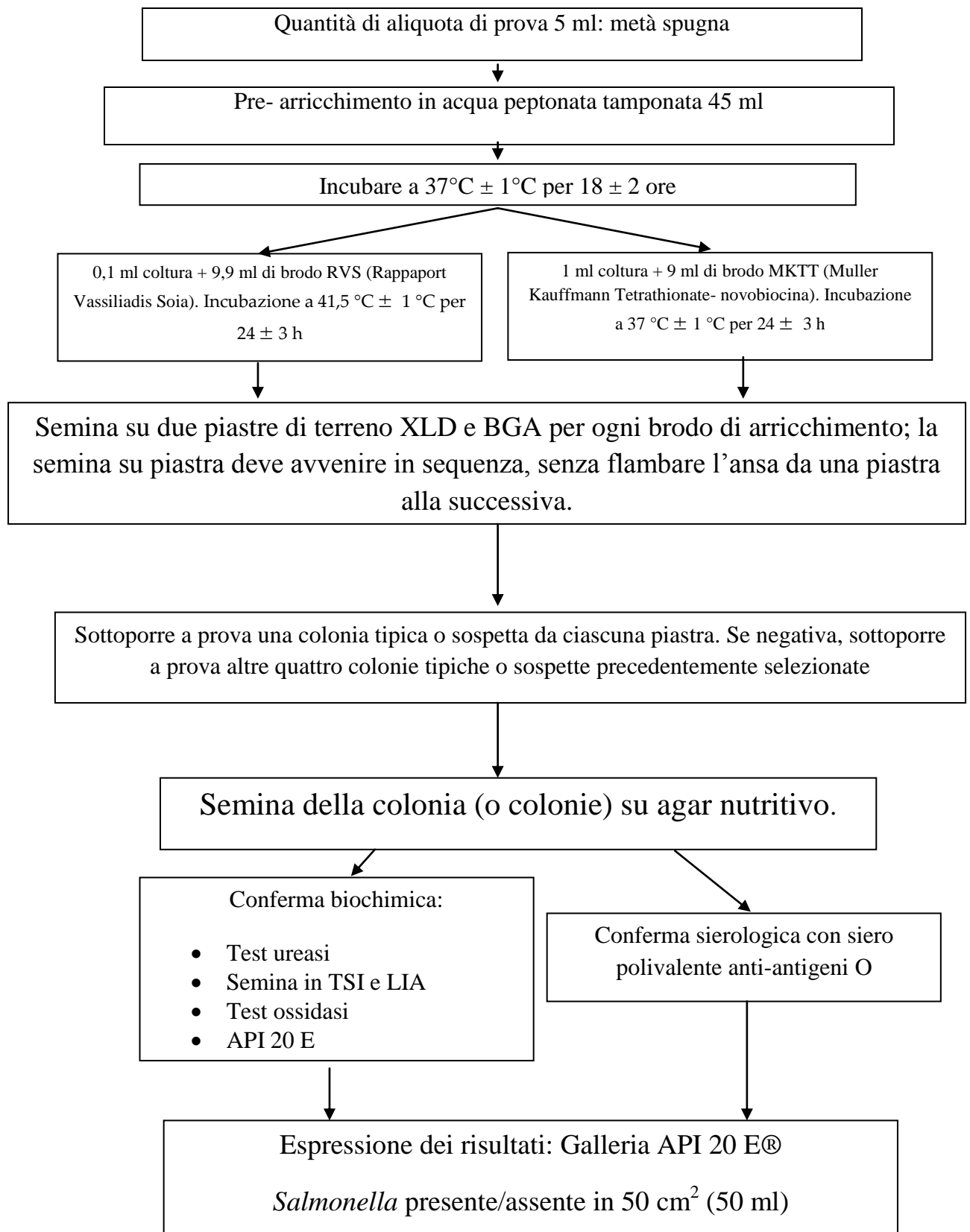


Figura 19: diagramma di flusso per la metodica analitica per la ricerca di *Salmonella* spp.

Per la ricerca di *Listeria monocytogenes* dai tamponi si è seguita una metodica analitica in accordo con la norma UNI EN ISO 11290 – parte 1:2005, predisposta secondo lo schema riportato in Figura 22. Le spugne sono state sottoposte ad una fase di arricchimento selettivo, aggiungendo una quantità pari a 45 ml di Fraser Broth a mezza concentrazione (Fraser Broth Base, Biolife codice Ref.4014952; Fraser Half Selective supplement, Biolife codice Ref.4240044) alla metà rimanente reidratata con 5 ml di BPW. Gli elementi selettivi presenti nel supplemento Fraser a mezza concentrazione sono l'acriflavina (2,81 mg) e l'acido nalidixico (2,25 mg). Questo costituisce l'arricchimento primario, che presenta una ridotta concentrazione degli agenti selettivi. Il campione di prova viene di seguito incubato a 30°C per 24 ore \pm 3 ore. Durante l'incubazione si potrebbe sviluppare una colorazione scura del medium. Successivamente dalle brodocolture, indipendentemente dalla colorazione che si è generata, si preleva un'aliquota di 0,1 ml e la si inocula in 10 ml di Fraser Broth a concentrazione intera (Fraser Broth Base, Biolife codice Ref.4014952; Fraser Selective supplement, Biolife codice Ref.4240043), il secondo terreno liquido di arricchimento selettivo, incubato a 37°C per 48 ore \pm 3 ore. Questo brodo di arricchimento secondario contiene una concentrazione intera di agenti selettivi: l'acriflavina (12,5 mg), l'acido nalidixico (10 mg). Le colture batteriche ottenute dal primo e dal secondo arricchimento sono state piastrate su terreni selettivo - differenziali solidi, indipendentemente

dal colore del brodo arricchito: questi sono rappresentati dall'agar *Listeria* secondo Ottaviani ed Agosti (ALOA agar *Listeria* Ottaviani Agosti - Biolife, codice Ref.4016052; ALOA Enrichment Selective supplement – Biolife, codice Ref.423501) e dall'Oxford agar (*Listeria* Oxford agar Base – Biolife, codice Ref.4016002; *Listeria* Oxford Antimicrobial supplement – Biolife, codice Ref.4240038). Il primo è imposto dalla norma UNI EN ISO 11290-1:2005, mentre la scelta del secondo è lasciata all'operatore, in modo che i due terreni siano complementari. Gli elementi selettivi contenuti nell'ALOA sono rappresentati dall'acido nalidixico, dal ceftazidime, dal cicloeximide, dal cloruro di litio e dalla polimixina B. Quelli presenti nell'Oxford agar sono il cicloeximide, la colistina, l'acri flavina, il cefotetan, il cloruro di litio e la fosfomicina. Le piastre Petri contenenti i terreni solidi sono state inoculate con un ansa di nichel, sterilizzabile dopo ogni operazione, per ottenere colonie ben separate. In seguito sono state incubate a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ed esaminate dopo 24 ore ± 3 ore. Se necessario, sono state ricontrollate dopo che erano trascorse ulteriori 24 ore ± 3 ore, per valutare la presenza di colonie caratteristiche. L'incubazione è stata prolungata nel caso in cui la crescita delle colonie era modesta o assente allo scadere delle prime 24 ore.

L'aspetto delle colonie tipiche su ALOA è mostrato in Figura 19: le colonie sospette hanno una classica colorazione verde-bluastro circondata da un alone biancastro opaco. La forma delle colonie è generalmente regolare con

marginini lisci e l'aspetto della colonia è lucido. La colorazione tipica della colonia è dovuta alla reazione specifica dei microrganismi appartenenti al genere *Listeria* con l'S-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranoside, presente nel terreno colturale. L'alone opaco è indice della capacità emolitica, per la reazione con il fosfatidil- inositolo. Alcuni ceppi di *L. monocytogenes* possono presentarsi con un alone debole o esserne privi completamente, soprattutto se esposti a condizioni stressanti (in particolare ad ambienti acidi). Infatti alcuni ceppi sono caratterizzati da una lenta attività della fosfolipasi C verso il fosfatidil- inositolo.

L'aspetto delle colonie tipiche su Oxford agar è mostrato in Figura 20: le colonie tipiche sono di colore grigiastro scuro, circondate da alone nero. Le dimensioni sono piccole, pari a 1 mm dopo 24 ore di incubazione. Dopo 48 ore le colonie diventano più scure, con un possibile riflesso verdastro, e le dimensioni sono di circa 22 mm di diametro. La superficie delle colonie diventa tipicamente infossata nella parte centrale (ombelicata) e tondeggiante.

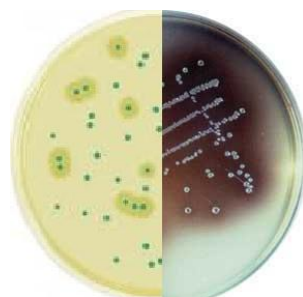


Figura 20: colonie tipiche di *Listeria* spp. sul terreno ALOA (sinistra) e Oxford agar (destra).

Le colonie sospette, sia derivanti il primo arricchimento che dal secondo, sono state sottoposte alle prove di conferma. Per lo scopo sono state prelevate 5 colonie sospette da ciascuna piastra di terreno selettivo – differenziale. In quelle con un numero di colonie sospette inferiore a 5, si è proceduto a prelevare tutte quelle presenti. Le colonie selezionate sono state sottocolturate su terreni a libera crescita (TSYEA) e incubate in termostato a 37°C per 18 ore- 24 ore. Le colonie sviluppatesi su questo terreno hanno dimensioni di 1-2mm di diametro, sono convesse e hanno un margine liscio. I ceppi isolati per essere definiti come appartenenti al genere *Listeria* sono stati testati con la colorazione di Gram, la reazione della catalasi e il test di illuminazione di Henry. All’osservazione con il microscopio ottico, i microrganismi appartenenti al genere *Listeria* appaiono nella loro forma tipicamente cocco-bacillare, pleomorfa. Si possono notare infatti bacilli corti e sottili, eventualmente associati in corte catene. I batteri inoltre danno una reazione positiva alla colorazione di Gram, assumendo una tonalità violacea, dovuta al legame con il violetto di genziana. Il test per valutare la presenza dell’enzima catalasi è stato svolto aggiungendo ad una goccia di perossido di idrogeno allo 0,3%, posta su un vetrino da osservazione, la patina microbica della colonia sospetta. La risposta positiva si evidenzia immediatamente attraverso la comparsa di bolle. Infine al test di illuminazione di Henry, effettuato con un raggio di luce potente incidente a 45° sulla piastra, le colonie di *Listeria* spp.

manifestano una colorazione bluastra e una superficie granulare. Le colonie, che hanno dato una reazione positiva ai tre test precedenti, sono state confermate come appartenenti al genere *Listeria* spp. e sono state sottoposte ad ulteriori analisi di conferma per *Listeria monocytogenes*. Le prove sono rappresentate dal CAMP test e dall'utilizzazione dei carboidrati. Il CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) test serve per mettere in luce la capacità β -emolitica di *Listeria monocytogenes*. Le piastre di terreno colturale solido contenenti sangue di pecora (Blood agar Sheep; Biolife, codice Ref.541151) sono state predisposte seguendo lo schema indicato in Figura 21. Il metodo di semina prevede che i ceppi batterici vengano inoculati seguendo delle linee rette singole. Lateralmente si seminano ceppi ATCC di *Rhodococcus. equi* e lo *Staphylococcus aureus* in posizione diametralmente opposta, ma parallela. La funzione è di favorire la comparsa dell'emolisi completa in corrispondenza dell'intersezione con ceppi di *L. monocytogenes*. I ceppi da testare infatti sono seminati sempre in linee singole staccate e parallele tra loro, in posizione perpendicolare rispetto alle linee corrispondenti al *Rhodococcus equi* e allo *Staphylococcus aureus*. È importante che i ceppi da testare non entrino in contatto con i due precedenti e per questo motivo le linee di semina dovrebbero terminare a 1-2 mm di distanza.

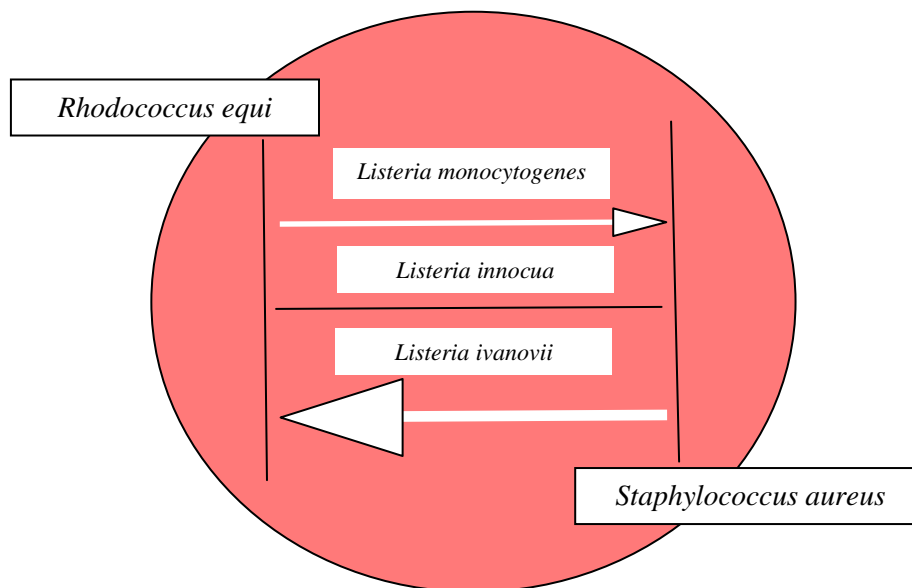


Figura 21: schema di allestimento del CAMP test. La prima linea orizzontale superiore mostra la reazione tipica di un ceppo di *L. monocytogenes*, contraddistinta da un'area di β -emolisi aderente alla linea di semina e da un'emolisi completa in corrispondenza dell'intersezione con *S. aureus*. *Listeria innocua* (al centro) non produce nessuna reazione, non essendo dotata di capacità emolitica, e viene pertanto impiegata come controllo negativo. L'ultima linea orizzontale in basso infine rappresenta la reazione di *L. ivanovii*, caratterizzata da un'area di β -emolisi molto ampia lungo la linea di semina e da un'emolisi completa nell'area di intersezione con *Rhodococcus equi*.

Le piastre così inoculate sono state incubate a 37°C per 18-24 ore. *L. monocytogenes* generalmente è l'unica all'interno del genere a possedere la capacità β -emolitica, evidenziata dalla comparsa di emolisi completa in corrispondenza dell'intersezione con *S. aureus*. L'unica eccezione è rappresentata dalla *Listeria ivanovii* che ha attività emolitica, anche se l'emolisi completa si forma all'intersezione con *R. equi*.

La parte finale della metodica analitica prevede valutazione della fermentazione dei carboidrati, ramnosio e xilosio. Il test è stato eseguito in micro metodo attraverso l'impiego di gallerie miniaturizzate API® Listeria (Biomérieux, codice Ref.10300), incubate a 37°C per 24 ore. *Listeria monocytogenes* fermenta il ramnosio, ma non lo xilosio. Pertanto sulla base di questo test è possibile differenziare *L. monocytogenes* da altri microrganismi appartenenti al genere *Listeria*: *L. ivanovii*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* (ramnosio -; xilosio +); *L. innocua*, *L. grayi* subsp. *grayi* e *L. grayi* subsp. *murrayi* (ramnosio -; xilosio +).

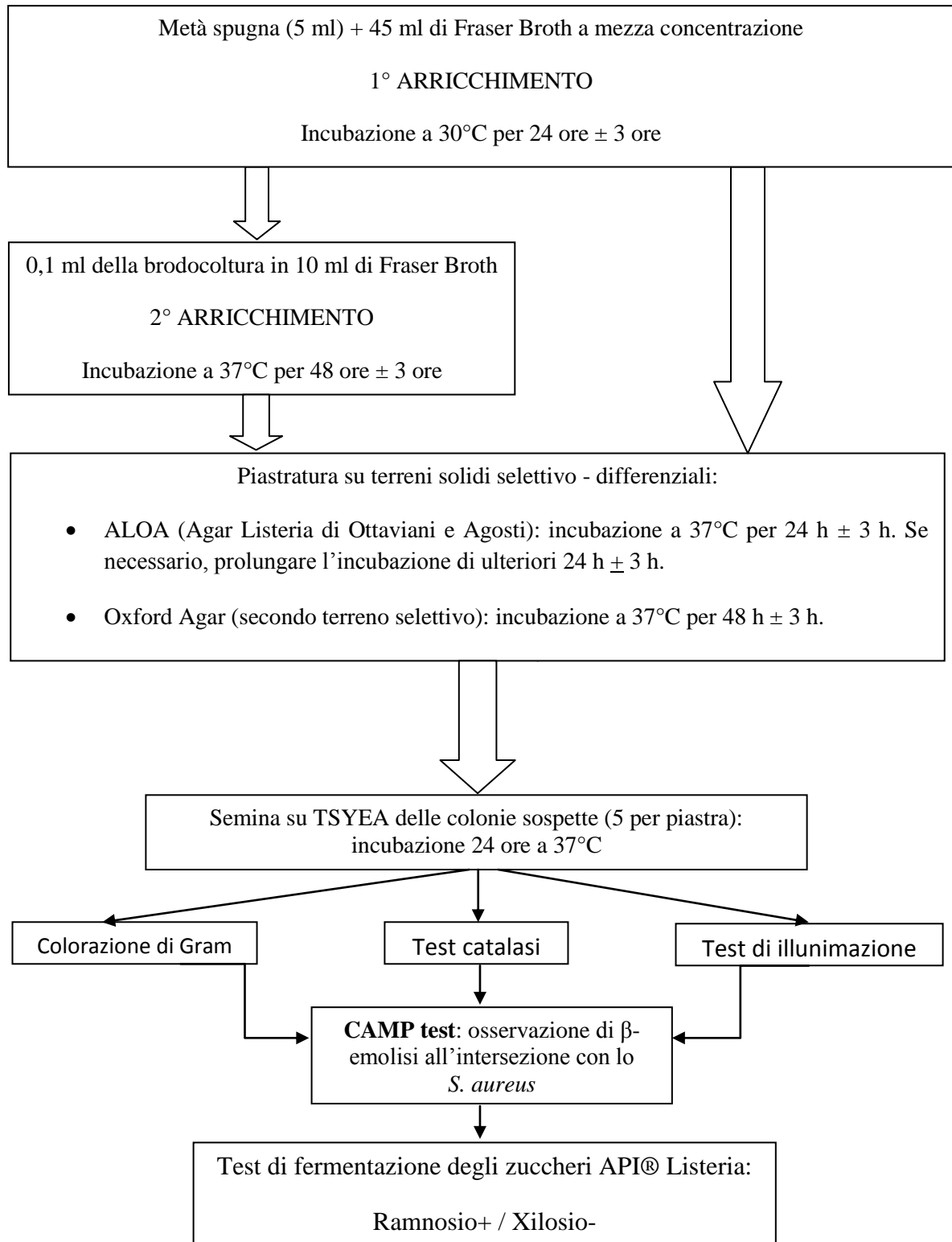


Figura 22: diagramma di flusso per la ricerca di *Listeria monocytogenes* in accordo con il metodo UNI EN ISO 11290 –parte 1:2005.

La rilevazione della temperatura superficiale delle mezzene è stata effettuata per ogni carcassa suina al termine della macellazione, appena dopo l'esecuzione dei tamponi superficiali per le analisi microbiologiche. Per lo scopo si è utilizzata una termo-camera ad infrarossi (modello FLIR® A20), che ha permesso di misurare la temperatura specifica per ogni sito campionato. Le immagini registrate sono poi state elaborate digitalmente su supporto elettronico con apposito programma per derivare la temperatura effettiva di coscia, addome, lombi e gola.

Le temperature delle cosce suine sono state misurate con rilevatori di temperatura tarati (TEMPSTICK® System, TECNO-Soft), le cui sonde sono state inserite in profondità nel muscolo mediale per registrare la temperatura a cuore. Questi dispositivi di misurazione della temperatura sono dei data loggers dotati di sensori sia interni che esterni, che permettono di registrare sia la temperatura al cuore del prosciutto, che quella dell'ambiente di conservazione, cioè la cella frigorifera. Il range di temperatura del sensore interno è $-20^{\circ}\text{C}/+65^{\circ}\text{C}$, mentre quello del sensore esterno è $-40^{\circ}\text{C}/+75^{\circ}\text{C}$. La risoluzione degli strumenti è pari a $0,03^{\circ}\text{C}$ con un'accuratezza di $\pm 0,25^{\circ}\text{C}$. Le sonde sono state posizionate all'interno delle cosce, una volta terminata la fase di asportazione dalla mezzena, al momento dell'ingresso nelle celle di refrigerazione. L'intervallo di registrazione delle temperature è stato fissato pari ad un minuto. A distanza di 24 ore, dopo che sono stati ripetuti i tamponi superficiali sulle cosce, le

sonde sono state rimosse e le registrazioni sono state trasferite su supporto informatico (MS Office 2007) ed elaborate per ottenere le relative curve di raffreddamento di ciascuna coscia.



Figura 23: apparecchi utilizzati per la rilevazione delle temperature. A sinistra termo camera FLIR® A20, mentre a destra sonda TEMPSTICK® System.

Risultati

Temperature superficiali delle carcasse - Le immagini relative alle mezzene riprese con l'impiego della termo-camera ad infrarossi hanno evidenziato un'alta uniformità delle temperature superficiali dei 4 siti considerati. Infatti, attraverso l'elaborazione digitale delle fotografie ottenute, si è visto che la coscia è caratterizzata da un valore medio di temperatura di $26,2^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, l'addome di $25,3^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, i lombi di $29,0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e la gola di $26,4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Analisi microbiologiche - I risultati delle analisi microbiologiche sono riassunti in tabella 1.

N. CARCASSA	SITO analizzato	DATA di campionamento	Numerazione microrganismi a 30°C		Numerazione Enterobacteriaceae		Presenza/Assenza di <i>Salmonella</i> spp. o di <i>Listeria monocytogenes</i>
			UFC/cm ²	log UFC/cm ²	UFC/ cm ²	log UFC/ cm ²	
1	C ₀	15/02/2010	9,0x10 ²	2,95	5	0,70	Assente
	C ₂₄	16/02/2010	5,1x10 ²	2,71	1	<0,04	Assente
	L	15/02/2010	2,7x10 ²	2,43	1	<0,04	Assente
	A	15/02/2010	2,8x10 ³	3,44	1,1x10 ²	2,04	Assente
	G	15/02/2010	6,4x10 ²	2,81	2	0,30	Assente
2	C ₀	9/03/2010	6,0x10 ¹	1,78	<0,5	<0,04	Assente
	C ₂₄	10/03/2010	1,1x10 ³	3,04	<0,5	<0,04	Assente
	L	9/03/2010	1,5x10 ¹	1,18	<0,5	<0,04	Assente
	A	9/03/2010	3,3x10 ²	2,52	1,4	0,15	Assente
	G	9/03/2010	6,0x10 ¹	1,78	<0,5	<0,04	Assente
3	C ₀	9/03/2010	4,0x10 ²	2,60	1,5x10 ¹	1,18	Assente
	C ₂₄	10/03/2010	3,3x10 ³	3,52	<0,5	<0,04	Assente
	L	9/03/2010	2,0x10 ¹	1,30	<0,5	<0,04	Assente
	A	9/03/2010	9,1x10 ²	2,96	6,7	0,83	Assente
	G	9/03/2010	2,1x10 ²	2,32	0,5	<0,04	Assente
4	C ₀	22/03/2010	2,3x10 ²	2,36	5	0,70	Assente
	C ₂₄	23/03/2010	2,5x10 ³	3,40	3,6	0,56	Assente
	L	22/03/2010	7,1x10 ¹	1,85	0,5	<0,04	Assente
	A	22/03/2010	1,8x10 ³	3,26	1,5	0,18	Assente
	G	22/03/2010	2,5x10 ¹	1,40	<0,3	<0,04	Assente

N. CARCASSA	SITO analizzato	DATA di campionamento	Numerazione microrganismi a 30° C		Numerazione Enterobacteriaceae		Presenza/Assenza di <i>Salmonella</i> spp. o di <i>Listeria monocytogenes</i>
			UFC/cm ²	log UFC/cm ²	UFC/cm ²	log UFC/cm ²	
5	C ₀	22/03/2010	4,3x10 ²	2,63	0,5	<0,04	Assente
	C ₂₄	23/03/2010	1,2x10 ⁴	4,08	0,75	<0,04	Assente
	L	22/03/2010	1,1x10 ²	2,04	1,3	0,11	Assente
	A	22/03/2010	4,5x10 ²	2,65	2,3	0,36	Assente
	G	22/03/2010	3,7x10 ³	3,57	7,5x10 ²	2,90	Assente
6	C ₀	29/03/2010	5,3x10 ¹	1,72	<1	<0,04	Assente
	C ₂₄	30/03/2010	8,4x10 ¹	1,92	<1	<0,04	Assente
	L	29/03/2010	2,4x10 ²	2,38	<0,25	<0,04	Assente
	A	29/03/2010	8,5x10 ²	2,93	6,1x10 ¹	1,79	Assente
	G	29/03/2010	1,6x10 ²	2,20	2,3	0,36	Assente
7	C ₀	29/03/2010	4,0x10 ¹	1,60	<1	<0,04	Assente
	C ₂₄	30/03/2010	2,6x10 ²	2,41	2	0,30	Assente
	L	29/03/2010	4,3x10 ¹	1,63	<0,25	<0,04	Assente
	A	29/03/2010	1,5x10 ²	2,18	1,1x10 ¹	1,04	Assente
	G	29/03/2010	8,5x10 ¹	1,93	5,9	0,77	Assente
8	C ₀	13/04/2010	4,9 x10 ²	2,69	<1	<0,04	Assente
	C ₂₄	14/04/2010	5,8 x10 ²	2,76	1,4	0,15	Assente
	L	13/04/2010	5,5	0,74	<1	<0,04	Assente
	A	13/04/2010	2,0 x10 ²	2,30	6,3 x10 ¹	1,80	Assente
	G	13/04/2010	3,8 x10 ²	2,58	5,2	0,72	Assente
9	C ₀	13/04/2010	2,4 x10 ²	2,38	<1	<0,04	Assente
	C ₂₄	14/04/2010	2,2 x10 ²	2,34	3,6	0,56	Assente
	L	13/04/2010	5,9	0,77	<1	<0,04	Assente
	A	13/04/2010	6,1 x10 ²	2,79	1,5	0,18	Assente
	G	13/04/2010	7,3 x10 ¹	1,86	1	<0,04	Assente
10	C ₀	3/05/2010	8,8 x10 ²	2,94	<0,25	<0,04	Assente
	C ₂₄	4/05/2010	9,8 x10 ¹	1,99	<0,25	<0,04	Assente
	L	3/05/2010	9,5 x10 ²	2,98	2,3	0,36	Assente
	A	3/05/2010	7,8 x10 ³	3,89	4,2 x10 ²	2,62	Assente
	G	3/05/2010	1,5 x10 ²	2,18	8,2	0,91	<i>Salmonella</i> Anatum
11	C ₀	3/05/2010	1,2 x10 ²	2,08	0,25	<0,04	Assente
	C ₂₄	4/05/2010	2,7 x10 ²	2,43	0,25	<0,04	Assente
	L	3/05/2010	6,8	0,83	<0,25	<0,04	<i>Salmonella</i> Anatum
	A	3/05/2010	6,3 x10 ³	3,80	6,8 x10 ¹	1,83	Assente
	G	3/05/2010	6,2 x10 ¹	1,79	1	<0,04	Assente
12	C ₀	10/05/2010	1,8 x10 ³	3,26	1	<0,04	Assente
	C ₂₄	10/05/2010	4,1 x10 ²	2,61	<0,25	<0,04	Assente
	L	10/05/2010	9,1 x10 ¹	1,96	1,6	0,20	Assente
	A	10/05/2010	1,0 x10 ³	3,00	2,5	0,40	<i>Salmonella</i> Derby
	G	10/05/2010	5,7 x10 ¹	1,76	<0,25	<0,04	Assente
13	C ₀	10/05/2010	6,5 x10 ³	3,81	1	<0,04	Assente
	C ₂₄	10/05/2010	5,4 x10 ²	2,73	<0,25	<0,04	Assente
	L	10/05/2010	2,7 x10 ²	2,43	1,2 x10 ¹	1,08	<i>Salmonella</i> Derby
	A	10/05/2010	4,2 x10 ¹	1,62	<0,25	<0,04	Assente
	G	10/05/2010	1,6 x10 ²	2,20	1,3	0,11	<i>Salmonella</i> Derby

N. CARCASSA	SITO analizzato	DATA di campionamento	Numerazione microrganismi a 30°C		Numerazione Enterobacteriaceae		Presenza/Assenza di <i>Salmonella</i> spp. o di <i>Listeria monocytogenes</i>
			UFC/cm ²	log UFC/cm ²	UFC/ml	log UFC/cm ²	
14	C ₀	14/06/2010	7,5 x10 ²	2,88	<0,25	<0,04	Assente
	C ₂₄	14/06/2010	2,1 x10 ²	2,32	<0,25	<0,04	Assente
	L	14/06/2010	3,1 x10 ¹	1,49	<0,25	<0,04	Assente
	A	14/06/2010	1,1 x10 ²	2,04	0,25	<0,04	Assente
	G	14/06/2010	1,1 x10 ⁴	4,04	2,2 x10 ¹	1,34	Assente
15	C ₀	14/06/2010	7,5 x10 ²	2,87	<0,25	<0,04	Assente
	C ₂₄	14/06/2010	8,0 x10 ²	2,90	5,8	0,76	Assente
	L	14/06/2010	3,9 x10 ¹	1,59	<0,25	<0,04	Assente
	A	14/06/2010	2,2 x10 ⁴	4,34	4,3 x10 ²	2,63	Assente
	G	14/06/2010	4,6 x10 ²	2,66	1,6	0,20	Assente

Tabella 1: risultati delle analisi microbiologiche nei vari siti sottoposti a campionamento (C₀= coscia al termine della macellazione; C₊₂₄= coscia al termine della refrigerazione a distanza di 24 ore dalla macellazione; L= lombi; A= addome; G= gola).

Salmonella enterica è stata isolata in 5 campioni appartenenti a 4 carcasse diverse, dato che in un caso (carcassa numero 13) era presente contemporaneamente nelle aree della gola e dei lombi. Nello specifico è stata rinvenuta due volte nel sito corrispondente alla gola, due volte nei lombi ed una sull'addome. Il sierotipo più frequente è risultato essere *S. Derby* con tre isolamenti, seguito da *S. Anatum* con i restanti due. Nella tabella 2 si riportano i profili di antibiotico-resistenza relativi ai ceppi di *S. enterica* isolati nel corso della ricerca. Tutti gli isolati sono risultati resistenti ad un solo antibiotico: l'ampicillina per i due sierotipi di *S. Anatum* e la tetraciclina per i tre sierotipi di *S. Derby*.

Numero identificativo ceppo		Cl	Sxt	K	Gm	N	Caz	Ctx	Amc	Na	Te	Amp	S	S3	C	Cf	Enr	Cip
S. Anatum	10 G	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
	11 L	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
S. Derby	12 A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
	13 L	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
	13 G	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S

Legenda: Cl: colistina; Sxt: sulfametossazolo+trimethoprin; K: kanamicina; Gm: gentamicina; N: neomicina; Caz: ceftazidime; Ctx: cefotaxime; Amc: amoxicillina+acido clavulanico; Na: acido nalidixico; Te: tetraciclina; Amp: ampicillina; S: streptomina; S3: sulfonamidi; C: cloramfenicolo; Cf: cefalotina; Enr: enrofloxacin; Cip: ciprofloxacina.

S= sensibile; R= resistente

Tabella 2: antibiotico-resistenza dei ceppi di *Salmonella* spp. isolati.

Listeria monocytogenes non è mai stata riscontrata né sulla mezzena al termine della macellazione, né sulle cosce campionate a distanza di 24 ore dopo la permanenza nelle celle frigorifere.

La numerazione dei microrganismi a 30°C ha registrato un valore medio pari a 2,38 log UFC/cm², considerando la media comprensiva dei 4 punti analizzati per le singole carcasse. Il valore inferiore era di 1,82 log UFC/ cm² mentre quello più elevato di 3,00 log UFC/ cm².

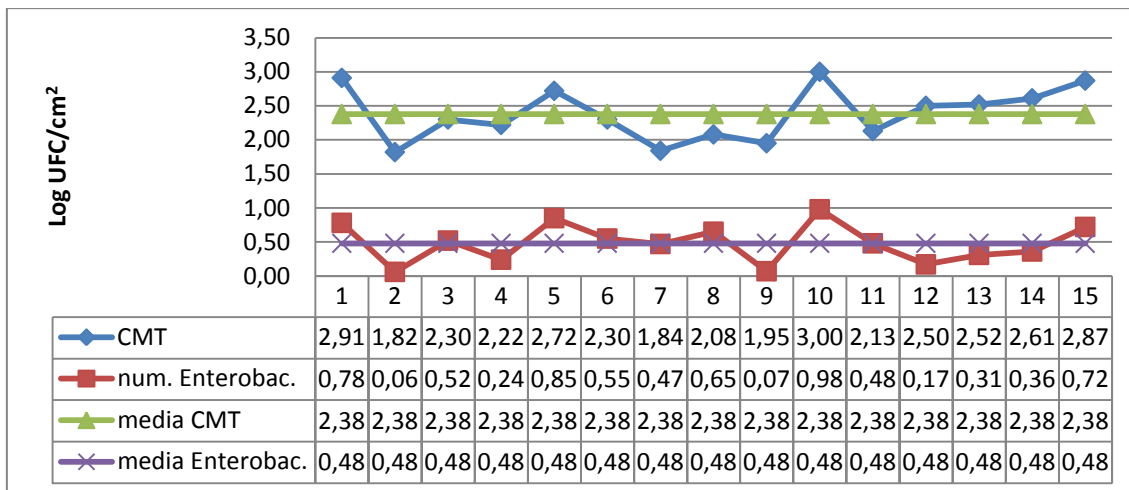


Figura 24: confronto fra la media dei i 4 punti di ogni carcassa testati e la media totale di tutte le carcasse relativamente ai parametri microbiologici indicatori dello stato igienico (numerazione dei microrganismi a 30°C, CMT; numerazione delle Enterobacteriaceae, Enterobac.).

In 7 casi su 15 (47%), la media del valore di contaminazione microbica generica della singola carcassa è stata superiore alla media complessiva delle 15 carcasse. In ogni caso i valori riscontrati sono sempre stati inferiori ai criteri microbiologici di “Igiene di processo” per le carcasse suine, indicati nel Reg. n. 2073/2005 e successive modifiche: $m= 4,0 \log \text{ UFC/ cm}^2$ (logaritmo medio giornaliero); $M= 5,0 \log \text{ UFC/ cm}^2$ (logaritmo medio giornaliero).

Nello specifico, tra le carcasse in cui almeno un sito è risultato positivo per *S. enterica* (n.10, n.11, n.12, n.13), tre (75%) hanno presentato una contaminazione microbica totale più elevata rispetto alla media (n.10, n.12, n.13).

I risultati relativi ai siti sulla carcassa (gola, coscia, lombi, addome) considerati singolarmente sono riportati in Figura 25.

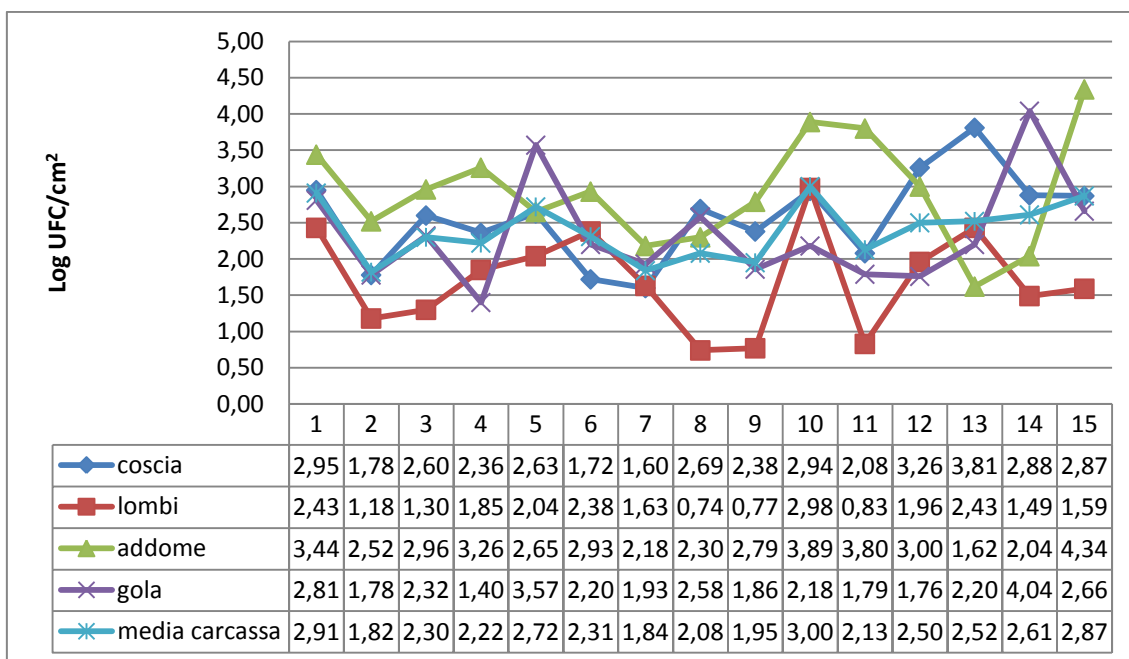


Figura 25: confronto fra i valori relativi alla numerazione dei microrganismi a 30°C nei siti esaminati considerati singolarmente e la media della carcassa rispettiva.

I lombi hanno fatto registrare un valore medio di contaminazione pari a 1,70 log UFC/cm², con un valore minimo di 0,74 log UFC/cm², uno massimo di 2,98 log UFC/cm² e una deviazione standard di 0,68 log UFC/cm². In 14 casi su 15 (93%), i lombi hanno avuto una contaminazione inferiore alla media tra tutti i siti della relativa carcassa. *Salmonella* spp. è stata isolata in due occasioni nei lombi (L. 11, L. 13), sebbene in entrambi i casi i valori rispettivi di contaminazione batterica generica fossero nettamente inferiori alla media della carcassa corrispondente.

L'addome ha fatto registrare un valore medio di contaminazione pari a 2,91 log UFC/cm², con un valore minimo di 1,62 log UFC/cm², uno massimo di 4,34 log UFC/cm² e una deviazione standard di 0,75 log UFC/cm². In tre casi su 15 (20%), l'addome ha presentato una contaminazione inferiore alla media tra tutti i siti della relativa carcassa. *Salmonella* spp. è stata isolata in una sola occasione (A. 12), ed esattamente in un'area il cui valore di contaminazione batterica generica si è mostrato superiore alla media della carcassa.

La gola ha fatto registrare un valore medio di contaminazione pari a 2,34 log UFC/cm², con un valore minimo di 1,40 log UFC/cm², uno massimo di 4,04 log UFC/cm² e una deviazione standard di 0,71 log UFC/cm². In 10 casi su 15 (67%), la gola ha presentato una contaminazione inferiore alla media tra tutti i siti della relativa carcassa. *Salmonella* spp. è stata isolata in due occasioni sulla gola (G. 10, G. 13), sebbene in entrambi i casi i valori di contaminazione batterica generica fossero inferiori alla media della carcassa corrispondente.

La coscia ha fatto registrare un valore medio di contaminazione pari a 2,57 log UFC/cm², con un valore minimo di 1,72 log UFC/cm², uno massimo di 3,81 log UFC/cm² e una deviazione standard di 0,60 log UFC/cm². In sei casi su 15 (40%), la coscia ha presentato una contaminazione inferiore alla media tra tutti i siti della relativa carcassa.

La numerazione delle Enterobacteriaceae ha rivelato un valore medio pari a 0,48 log UFC/cm², considerando la media dei 4 siti campionati nelle singole carcasse. Il valore inferiore riscontrato è stato 0,06 log UFC/cm² nella carcassa n.2, carica microbica molto vicina al limite di sensibilità del metodo analitico (<1 UFC/cm²). Il valore più elevato invece è stato pari a 0,98 log UFC/cm² e quindi i parametri di igiene del processo fissati dal Reg. CE n. 2073/2005, e successive modifiche, sono sempre stati rispettati in tutte le carcasse analizzate. Come si può notare dalla Figura 24, 7 carcasse su 15 (47%) avevano un valore complessivo di Enterobacteriaceae superiore alla media. Tuttavia queste carcasse (n. 1, n. 3, n. 5, n. 6, n. 8, n. 10, n. 15) non corrispondono perfettamente alle carcasse che hanno presentato valori di CMT superiori alla media complessiva (n. 1, n. 5, n. 10, n. 12, n. 13, n. 14, n. 15): questa correlazione tra gli indicatori microbiologici considerati si è osservata in soli quattro casi (n. 1, n. 5, n. 10, n. 15). D'altra parte, queste quattro carcasse sono quelle che hanno presentato i valori più elevati di CMT ed Enterobacteriaceae.

Mettendo in correlazione i risultati relativi alla presenza di *Salmonella* spp. e alla numerazione di Enterobacteriaceae, si può rilevare che su quattro carcasse risultate positive per la presenza di *Salmonella* spp. (n. 10, n. 11, n. 12, n. 13), solo una, la n. 10, era caratterizzata da una contaminazione da Enterobacteriaceae superiore alla media, una, la n. 11, presentava valori

uguali alla media, mentre nelle restanti mostravano valori di Enterobacteriaceae inferiori alla media. Pertanto questa correlazione tra i risultati microbiologici è stata registrata solo in un caso su quattro (25%), considerando le carcasse positive per *Salmonella* spp., e in un caso su 7 (14%), avendo come riferimento le carcasse suine con valori di Enterobacteriaceae superiori alla media.

I risultati specifici relativi ai singoli siti della carcassa (gola, coscia, lombi, addome) sono riportati in Figura 26.

I lombi hanno avuto un valore medio di contaminazione di 0,14 log UFC/cm², con valore minimo pari alla sensibilità del metodo analitico (n. 1, n. 2, n. 3, n. 4, n. 6, n. 7, n. 8, n. 9, n. 11, n. 14, n. 15) ed un valore massimo di 1,08 log UFC/cm² (n. 13), con una deviazione standard di 0,68 log UFC/cm². In 13 casi su 15 (87%) il valore di contaminazione dei lombi è risultato inferiore alla media della rispettiva carcassa, vista la frequenza elevata di risultati inferiori alla soglia di rilevabilità del metodo analitico. Tuttavia *Salmonella* spp. è stata isolata due volte (L. 11, L. 13). Il sito corrispondente ai lombi nella carcassa n. 11 ha fatto registrare un valore di Enterobacteriaceae inferiore alla media della carcassa, addirittura inferiore alla sensibilità della metodica analitica, mentre i lombi della carcassa n. 13 hanno presentato una contaminazione pari a 1,08 log UFC/cm², che è stato il valore più elevato in assoluto tra i 15 tamponi eseguiti sui lombi.

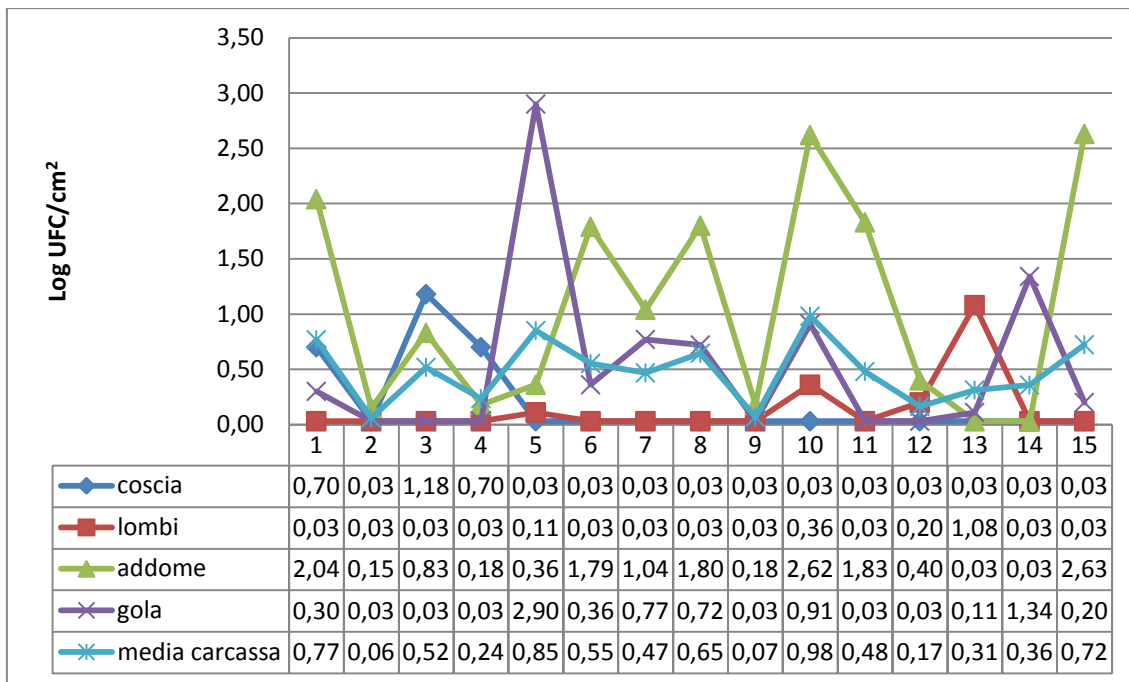


Figura 26: confronto fra i valori relativi alla numerazione delle Enterobacteriaceae nei siti esaminati, considerati singolarmente, e la media della rispettiva carcassa.

L'addome ha fatto registrare una contaminazione media di Enterobacteriaceae di 1,06 log UFC/cm², un valore minimo pari alla sensibilità della metodica analitica, un valore massimo di 2,62 log UFC/cm² ed una deviazione standard di 0,96 log UFC/cm². In 11 casi su 15 (73%) la contaminazione di questo sito è stata superiore alla media della carcassa di appartenenza, mentre in quattro casi (A. 4, A. 5, A. 13, A. 14) è risultata inferiore: tra queste, in due casi (A. 13, A. 14) le Enterobacteriaceae non sono state rilevate. *Salmonella* spp. è stata isolata in un'occasione nell'area dell'addome (A. 12), quindi in uno degli 11 campioni (9%) in cui la contaminazione da Enterobacteriaceae è risultata superiore alla media della carcassa corrispondente.

La gola ha fatto registrare un valore medio di contaminazione di 0,52 log UFC/cm², un valore minimo pari alla sensibilità della metodica analitica, un valore massimo di 2,9 log UFC/cm² ed una deviazione standard di 0,77 log UFC/cm². In quattro casi su 15 (27%) l'area della gola ha presentato una contaminazione superiore alla media della carcassa. Tuttavia nei siti in cui è stata isolata *Salmonella* spp. (G. 10, G. 13), il valore numerico di Enterobacteriaceae è risultato inferiore alla media della carcassa.

La coscia, infine, ha presentato un valore medio di contaminazione di 0,20 log UFC/cm², un valore minimo pari alla sensibilità della metodica analitica, un valore massimo di 1,18 log UFC/cm² ed una deviazione standard di 0,36 log UFC/cm². In 13 casi su 15 (87%) la coscia ha fatto registrare una contaminazione inferiore alla media della carcassa, tra cui 12 aree su 15 (80%) hanno evidenziato una carica inferiore alla sensibilità della metodica colturale.

I risultati delle analisi microbiologiche effettuate sulle cosce al termine della macellazione, ma prima del raffreddamento (T_0), e ripetute a distanza di 24 ore nella celle frigorifere (T_{+24}), sono riportati in Tabella 3. Nella suddetta tabella sono indicate, inoltre, per ciascuna coscia la temperatura iniziale e quella finale, oltre che il tempo impiegato per raggiungere temperature inferiori a 20°C, 10°C e 4°C.

coscia	numerazione dei microrganismi a 30°C		numerazione delle Enterobacteriaceae		Temperatura (°C)		Tempo (min)		
	T ₀	T ₊₂₄	T ₀	T ₊₂₄	T ₀	T ₊₂₄	<20°C	<10°C	<4°C
C. 1	2,95	2,71	0,70	<0,04	29,01	0,6	80	419	792
C. 2	1,78	3,04	<0,04	<0,04	31,54	0,99	128	584	965
C. 3	2,60	3,52	1,18	<0,04	28,69	0,01	74	400	766
C. 4	2,36	3,40	0,70	0,56	26,31	0,15	57	383	755
C. 5	2,63	4,08	<0,04	<0,04	29,32	-0,19	86	415	763
C. 6	1,72	1,92	<0,04	<0,04	33,28	1,52	136	602	982
C. 7	1,60	2,41	<0,04	0,30	36,51	2,06	286	700	1070
C. 8	2,69	2,76	<0,04	0,15	32,82	1,83	170	591	985
C. 9	2,38	2,34	<0,04	0,56	34,4	0,5	142	501	834
C. 10	2,94	1,99	<0,04	<0,04	35,42	1,26	205	589	949
C. 11	2,08	2,43	<0,04	<0,04	32,08	1,7	136	581	975
C. 12	3,26	2,61	<0,04	<0,04	35,27	1,23	199	604	950
C. 13	3,81	2,73	<0,04	<0,04	33,04	2,13	190	693	1067
C. 14	2,88	2,32	<0,04	<0,04	30,44	1,13	118	485	873
C. 15	2,87	2,90	<0,04	0,76	30,65	1,02	134	506	872

Tabella 3: valori relativi alla numerazione dei microrganismi a 30°C e delle Enterobacteriaceae delle cosce al termine della macellazione (T₀) e a distanza di 24 ore (T₊₂₄), espressi in unità logaritmiche per cm². Nella parte destra sono riportate le temperature delle relative cosce iniziali e finali, nonché i tempi (espressi in minuti) per il raggiungimento di temperature target.

Temperature di raffreddamento delle cosce - La media delle temperature delle cosce registrata al T₀ è stata pari a 31,92°C, con un valore minimo di 26,31°C, nella coscia n. 4, e un valore massimo di 36,51°C nella coscia n. 7. Le cosce, inoltre, hanno raggiunto in media una temperatura inferiore a 20°C, 10°C e 4°C rispettivamente in 142,73 minuti (tempo minimo di 57 minuti; tempo massimo di 286 minuti), in 536,87 minuti

(tempo minimo di 383; tempo massimo di 700 minuti) e in 906,53 minuti (tempo minimo di 755; tempo massimo di 1070 minuti).

Analisi microbiologiche delle cosce - Per quanto riguarda la numerazione dei microrganismi a 30°C (Figura 27), il valore di contaminazione medio delle 15 cosce subito dopo la macellazione si è attestato a 2,57 log UFC/cm², con una deviazione standard di 0,60 log UFC/cm². Il livello di contaminazione inferiore è stato di 1,60 log UFC/cm², mentre quello superiore è stato di 3,81 log UFC/cm². Il valore medio rilevato sulle medesime cosce a distanza di 24 ore è stato pari a 2,74 log UFC/cm², con una deviazione standard pari a 0,58 log UFC/cm², un valore massimo di 4,08 log UFC/cm² e uno minimo di 1,92 log UFC/cm². La differenza tra le medie della numerazione dei microrganismi a 30°C subito dopo la macellazione (T₀) e a distanza di 24 ore (T₊₂₄), considerando le 15 cosce, non si è rivelata statisticamente significativa secondo il test t di Student. In 9 casi c'è stato un aumento tra il T₀ e il T₊₂₄, di cui 5 (C. 2, C. 3, C. 4, C. 5, C. 7) hanno visto un aumento statisticamente significativo ($p < 0,01$) con un valore t di 0,0007. Nei rimanenti 6 casi, invece, c'è stata una diminuzione e in 4 di questi (C10, C12, C13, C14) il calo è stato statisticamente significativo ($p < 0,01$), avendo un valore t pari a 0,0071.

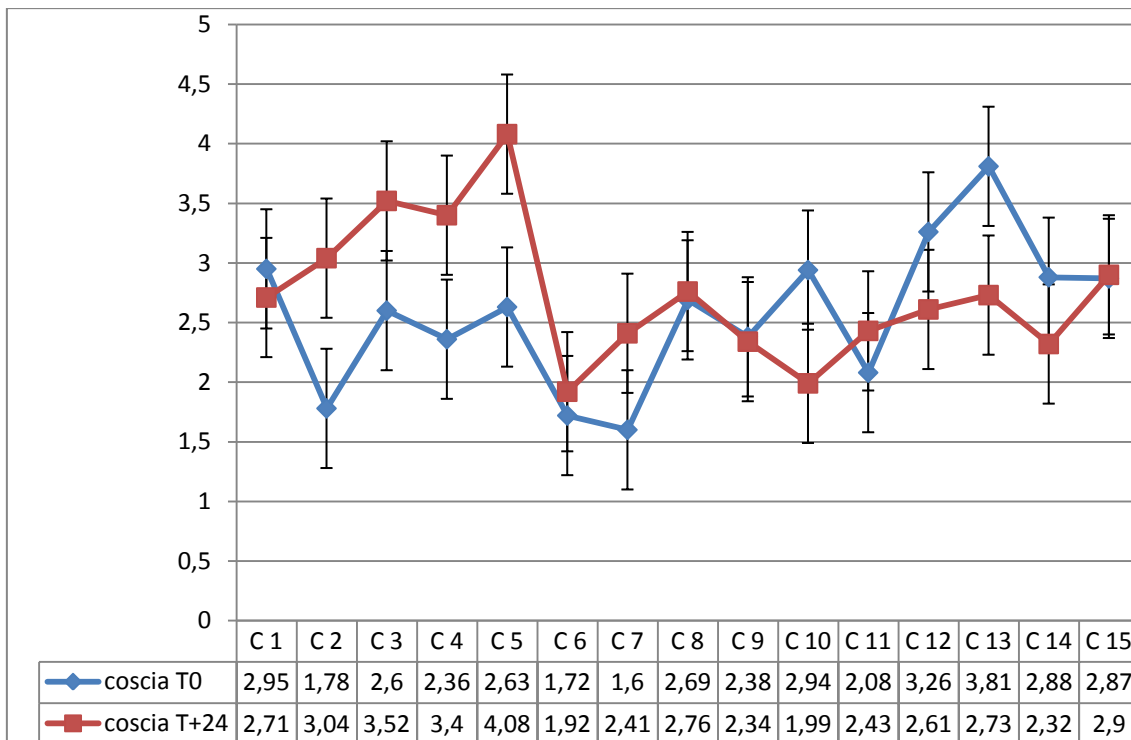


Figura 27: valori relativi alla numerazione dei microrganismi a 30°C delle 15 cosce, testate al termine della macellazione (T_0) e dopo 24 ore di permanenza nelle celle frigorifere (T_{+24}), espressi in unità logaritmiche di UFC/cm².

Per quanto riguarda la numerazione delle Enterobacteriaceae (Figura 28), i livelli di contaminazione, sia a T_0 che a T_{+24} , nella maggior parte dei casi (rispettivamente 12 casi/15 a T_0 e 10 casi/15 a T_{+24}) sono stati inferiori a 0,04 log UFC/cm², soglia di rilevabilità del metodo analitico. A T_0 il valore più alto di Enterobacteriaceae è stato di 1,18 log UFC/cm², mentre a T_{+24} è stato di 0,76 log UFC/cm². In 3 cosce (C. 1, C. 2, C. 3) c'è stata una diminuzione e in 4 (C. 7, C. 8, C. 9, C. 15) invece c'è stato un aumento, ma non è stata possibile un'elaborazione statistica per i livelli di contaminazione spesso molto bassi e l'elevata frequenza dei risultati inferiori alla soglia di rilevazione. In un solo caso (C. 7) si è potuta

osservare la concordanza tra gli indicatori microbiologici considerati, essendoci stato un aumento sia della numerazione dei microrganismi a 30°C che delle Enterobacteriaceae tra T_0 e T_{+24} .

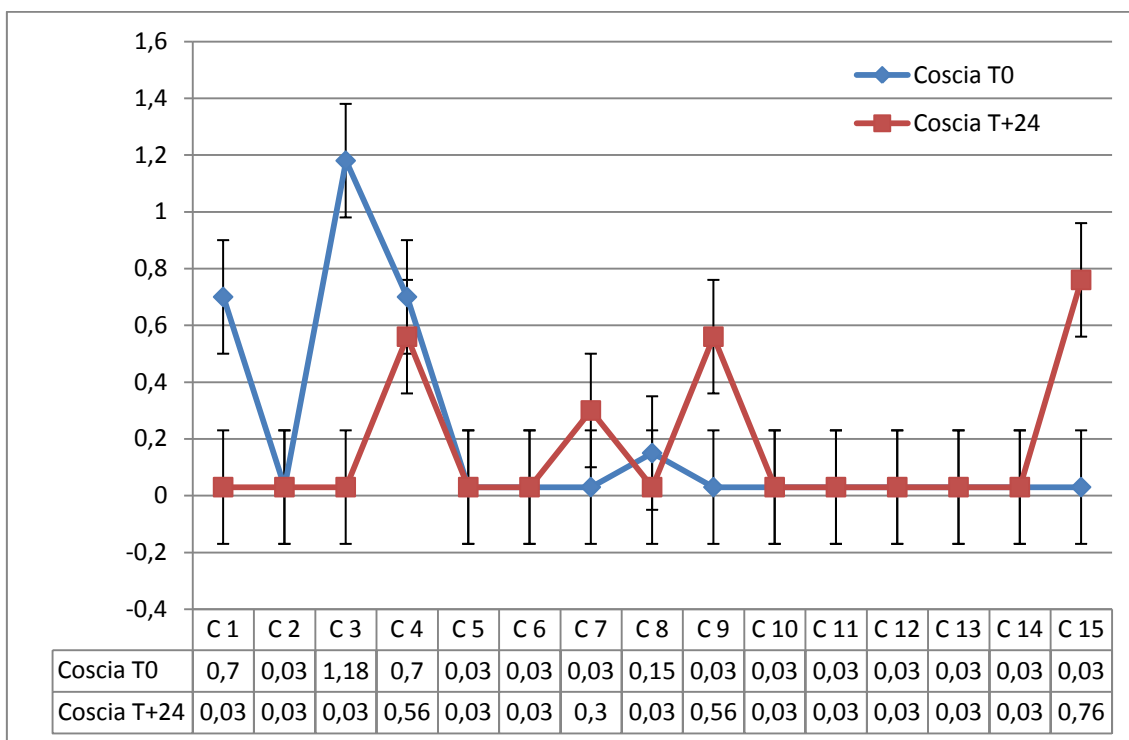


Figura 28: valori relativi alla numerazione delle Enterobacteriaceae sulle 15 cosce, testate al termine della macellazione (T_0) e dopo 24 ore nella celle frigorifere (T_{+24}), espressi in unità logaritmiche di UFC/cm².

Come si evince dalla Tabella 3, le cosce che hanno visto un aumento dei valori di numerazione dei microrganismi a 30°C tra il T_0 e il T_{+24} (C. 2, C. 3, C. 4, C. 5, C. 7) hanno fatto registrare in media una temperatura iniziale di 30,47°C e hanno raggiunto una temperatura inferiore a 20°C, 10°C e 4°C rispettivamente a 126,2 minuti, 496,4 minuti e 863,8 minuti. I valori minimi sono stati riscontrati nella coscia n. 4 (26,31°C a T_0 ; 57 minuti, 383 minuti e 755 minuti rispettivamente) mentre quelli massimi

nella coscia n. 7 (36,51°C a T_0 ; 286 minuti, 700 minuti e 1070 minuti rispettivamente). Le cosce che hanno visto una diminuzione dei valori di numerazione dei microrganismi a 30°C tra il T_0 e il T_{+24} (C. 10, C. 12, C. 13, C. 14) hanno fatto registrare in media una temperatura iniziale di 33,54°C e hanno raggiunto una temperatura inferiore a 20°C, 10°C e 4°C rispettivamente a 178 minuti, 592,75 minuti e 959,75 minuti. I valori minimi sono stati riscontrati nella coscia n. 14 (30,44°C a T_0 ; 118 minuti, 485 minuti e 873 minuti rispettivamente), mentre quelli massimi nella coscia n. 10 (T_0 di 35,42°C e 205 minuti per raggiungere una temperatura <10°C) e nella coscia n. 13 (700 e 1070 minuti per raggiungere temperature inferiori a 10°C e 4°C).

Discussione

Il presente studio ha messo in luce una prevalenza di contaminazione delle carcasse suine da parte *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes* in linea con studi precedenti. *Salmonella* spp., infatti, è stata isolata in 4 carcasse su 15, con una prevalenza pari al 26,7%, quindi compresa nel range 5-30%, stima di Berends e collaboratori (1997) per le carcasse suine. Al contrario, *L. monocytogenes* non è stata isolata da nessun sito campionato e questo fatto potrebbe essere legato al ridotto numero di carcasse che sono state oggetto di indagine. Bonardi e collaboratori (2002), infatti, hanno indicato che la contaminazione delle carcasse suine da parte di questo microrganismo si aggira su percentuali di circa lo 0,7%.

I sierotipi di *Salmonella* spp. riscontrati (3 *S. Derby*, 2 *S. Anatum*) risultano compresi tra quelli più frequentemente isolati dai suini da ingrasso (EFSA e ECDC, 2011). Per quanto riguarda il profilo di antibiotico-resistenza dei ceppi testati, l'ampicillina e la tetraciclina sono antibiotici verso i quali *Salmonella* spp. mostra le frequenze più elevate di resistenza, sia a livello italiano che europeo (EFSA e ECDC, 2011). A questo proposito, il fatto che i due sierotipi di *S. Derby* isolati dai lombi e dalla gola della carcassa numero 13 abbiano lo stesso profilo di resistenza verso gli antimicrobici (R-type: Te) potrebbe indicare una fonte di contaminazione comune per entrambi i siti. Infine, dato che *Salmonella*

spp. non sia mai stata isolata dalle cosce, non è stato possibile valutare l'influenza della refrigerazione sulla crescita del microorganismo.

I parametri microbiologici indicatori di igiene (numerazione dei microrganismi a 30°C ed Enterobacteriaceae) hanno avuto esiti discordanti. Considerando la media delle contaminazioni dei 4 siti analizzati per ciascuna carcassa, entrambi hanno individuato un numero pari a 7 carcasse con cariche microbiche superiori alla media totale di tutte le carcasse, anche se queste non sono sovrapponibili esattamente per entrambi i parametri. Questa osservazione trova conferma nel fatto che, considerando le carcasse contaminate da *Salmonella* spp. (n. 10, n. 11, n. 12, n. 13), 3 (75%) erano contraddistinte da valori di CMT superiori alla media delle carcasse, mentre solo 1 (25%), la n. 10, presentava una contaminazione da Enterobacteriaceae superiore alla media. Questa discrepanza si rileva anche dalla percentuale di isolamento di *Salmonella* spp. tra le carcasse con cariche microbiche superiori alla media per ciascun parametro microbiologico. Tra le 7 carcasse contraddistinte da valori di CMT sopra la media, 3 (43%) hanno visto l'isolamento di *Salmonella* spp. da almeno un sito. Al contrario, tra le 7 carcasse con valori di Enterobacteriaceae sopra alla media, solo 1 (14%), la n. 10, era contaminata da *Salmonella* spp. (*S. Anatum*); un'altra (n. 11) presentava una contaminazione da Enterobacteriaceae pari alla media, pur essendo stata isolata *Salmonella* anche in questo caso. Pertanto, secondo questi dati, la numerazione dei

microrganismi a 30°C è un parametro dotato di una maggiore correlazione verso la presenza di *Salmonella* spp., rispetto alle Enterobacteriaceae, considerando però la contaminazione complessiva della carcassa.

La numerazione dei microrganismi a 30°C ha indicato l'addome come l'area con la maggior probabilità di contaminazione, visto il valore medio pari a 2,91 log UFC/cm², che è stato quello più elevato in assoluto tra tutte le 4 aree, seguito dalla coscia, dalla gola e per ultimo dai lombi. Questo ordine è rispettato anche considerando il numero di volte in cui ciascun sito ha fatto registrare una contaminazione superiore alla media della relativa carcassa: 12 volte per l'addome, 8 volte per la coscia, 5 volte per la gola e solo una per i lombi. Tuttavia bisogna considerare che l'addome è contraddistinto anche dalla deviazione standard maggiore, il che potrebbe significare che la regione ventrale risente più delle altre dei comportamenti igienici degli operatori e del grado di pulizia di attrezzature od utensili, considerato il livello di manipolazione maggiore e l'esposizione a fattori di rischio importanti come l'eviscerazione.

La coscia, al contrario, ha presentato la deviazione standard inferiore a tutti gli altri siti (0,60 log UFC/cm²), il che significa che la contaminazione microbica in questa area è abbastanza stabile e potrebbe quindi dipendere in maniera preponderante dal carico microbico intrinseco dell'animale prima dell'ingresso in macellazione. D'altra parte, pur essendo il secondo sito per entità di contaminazione microbica e numero di volte sopra alla

media di carica microbica della relativa carcassa (sopravanzato solo dall'addome), la coscia non ha portato a nessun isolamento di *Salmonella* spp.

Il valore di CMT di ciascuna area considerata singolarmente ha una correlazione inferiore, rispetto quello desunto dalla media dei 4 siti per ogni carcassa, con il rischio di contaminazione da *Salmonella* spp. infatti, nei due casi in cui il microrganismo è stato isolato dai lombi (L. 11, L. 13), i rispettivi valori di numerazione dei microrganismi a 30°C erano inferiori alla media della carcassa. Questa considerazione è avvalorata dalle differenze statisticamente significative, secondo il test t di Student, tra i valori di CMT di lombi vs. addome ($p < 0,01$) e di lombi vs. gola ($p < 0,05$). Pur essendoci notevole differenza tra le cariche microbiche di questi siti (scarto tra le medie di circa 1 unità logaritmica di UFC/cm²), che potrebbero essere disposti in categorie di rischio distinte sulla base dei risultati della CMT, l'esposizione al rischio *Salmonella* spp. si è dimostrata identica per lombi e gola (2 isolamenti ciascuno) e addirittura inferiore per l'addome (un solo isolamento).

La numerazione delle Enterobacteriaceae ha indicato l'addome come l'area con la maggior probabilità di contaminazione, con un valore medio pari a 1,06 log UFC/cm², seguito dalla gola (0,52 log UFC/cm²), dalla coscia (0,20 log UFC/cm²) e per ultimo dai lombi (0,14 log UFC/cm²).

L'addome, infatti, solo in 4 casi ha avuto una contaminazione da Enterobacteriaceae inferiore alla media della carcassa associata, di cui 2 sotto al limite di rilevabilità, mentre la gola 11 (di cui 6 al di sotto della sensibilità del metodo analitico), la coscia 13 (di cui 12 al di sotto della sensibilità del metodo analitico) e i lombi 13 (di cui 11 al di sotto della sensibilità del metodo analitico). Tuttavia è la gola che ha rappresentato l'area con la contaminazione da Enterobacteriaceae maggiore, con un valore di 2,90 log UFC/cm². Come per la numerazione dei microrganismi a 30°C, bisogna considerare che l'addome è il sito con la deviazione standard maggiore (0,96 log UFC/cm²), il che segnala una grande variabilità del livello di contaminazione tra una carcassa e l'altra. Per questo motivo questo sito potrebbe essere quello maggiormente indicativo per rivelare una scorretta applicazione delle GHP. D'altra parte, se si considera che questo parametro microbiologico è maggiormente associato ad una contaminazione di tipo fecale, potrebbe essere un segnale importante per stabilire quando la velocità della catena di macellazione non è adeguata alla messa in atto delle buone pratiche di lavorazione, che potrebbe indurre l'operatore, per eccessiva fretta, ad incidere la parete intestinale con la conseguente fuoriuscita di materiale altamente contaminante.

La contaminazione da Enterobacteriaceae di ciascuna area considerata singolarmente ha avuto una correlazione maggiore, rispetto al valore di CMT del relativo sito, per quanto concerne l'esposizione al rischio di

contaminazione da *Salmonella* spp. L'addome appartenente alla carcassa numero 12, come per la CMT, ha presentato una contaminazione da Enterobacteriaceae superiore alla media della relativa carcassa. In aggiunta, i lombi della carcassa 13 hanno fatto registrare una contaminazione maggiore alla media della carcassa (presentando il valore più alto in assoluto per il sito). Inoltre, considerando come elemento di paragone la media dei valori di Enterobacteriaceae del sito in esame e non della carcassa, anche la gola appartenente alla carcassa 10 risulta superiore (0,91 log UFC/cm² contro 0,52 log UFC/cm²). Tuttavia, come per la CMT, si sono rilevate differenze statisticamente significative, secondo il test t di Student, tra i valori di Enterobacteriaceae di lombi e addome ($p < 0,01$). Essendoci una differenza di circa 1 unità logaritmica di UFC/cm² tra le medie delle 2 aree (lombi 0,14 log UFC/cm²; addome 1,06 log UFC/cm²), l'addome potrebbe essere erroneamente incluso in una categoria di rischio maggiore per quanto riguarda *Salmonella* spp., anche se in realtà il microrganismo è stato isolato contrariamente alle aspettative, in 2 casi nei lombi ed solo in uno nell'addome.

In definitiva, l'analisi dei risultati evidenzia un'associazione più forte tra la numerazione delle Enterobacteriaceae e la presenza di *Salmonella* spp., rispetto alla numerazione dei microrganismi a 30°C, se si considera il grado di contaminazione del sito specifico in cui è stato isolato il microrganismo. Le aree contraddistinte da valori di Enterobacteriaceae

sopra alla media della relativa carcassa, infatti, hanno avuto un'esposizione maggiore al di rischio di contaminazione da *Salmonella* spp. (OR 1,44; IC 95%: 0,26-7,91). Al contrario i valori di CMT non hanno rappresentato un fattore di rischio per *Salmonella* spp., anzi si è osservata una più elevata presenza di *Salmonella* nei siti che presentavano valori inferiori al valore medio di contaminazione della carcassa associata (OR 0,33; IC 95%: 0,04-2,75), probabilmente per una più spinta competizione della flora batterica generica.

Per valutare l'influenza della temperatura sul possibile isolamento di *Salmonella* spp. nelle aree specifiche, i quattro siti oggetto di studio sono stati categorizzati in funzione delle temperature registrate dalla termocamera. Essendo i lombi il sito con la temperatura più elevata (29,0°C) e l'addome con quella più bassa (25,3°C), si è scelto come valore discriminativo tra area "calda" e "fredda" la mediana, pari a 27,1°C. Pertanto la coscia, l'addome e i lombi risultano essere siti "freddi", mentre i lombi l'unico sito "caldo". Sulla base di questa classificazione, si è osservato che la proporzione tra i siti "caldi" dai quali si è isolata *Salmonella* spp. non mostra una differenza statisticamente significativa con la proporzione dei siti positivi per *Salmonella* spp. tra quelli ritenuti "freddi". Tuttavia, la temperatura più elevata ha comportato un rischio

maggiore per la presenza di *Salmonella* spp. (OD: 2,00; IC 95%: 0,37-10,85).

Nel presente studio i livelli di contaminazione da Enterobacteriaceae sulle cosce al termine della macellazione e a distanza di 24 ore, a raffreddamento avvenuto, sono stati nella maggior parte dei casi sotto la soglia di rilevabilità. Questo fatto non ha permesso di poter eseguire valutazioni statistiche. Come dimostrato da altri studi (Jacxsens *et al.*, 2009), le Enterobacteriaceae sono riscontrate in basse cariche sui prosciutti dopo la refrigerazione, mentre si registrano alti livelli di contaminazione per quanto riguarda le superfici a contatto con gli alimenti nei locali di sezionamento.

Confrontando tra loro le curve di abbattimento termico delle cosce in cui vi è stata una riduzione dei valori di CMT con quelle che hanno registrato un aumento, appare evidente che nella maggior parte dei casi le prime, in linea generale, hanno temperature a T_0 maggiori e tempi di abbattimento termico più elevati rispetto alle altre. L'aumento della CMT nelle cosce n. 2, n. 3, n. 4 e n. 5, è poco probabile che si possa essere verificato durante la permanenza nelle celle di refrigerazione, in quanto la proliferazione della flora batterica generica, a temperature di refrigerazione, generalmente non avviene prima di 72 ore (Mann *et al.*, 2004).

Tali osservazioni consentono di supporre, pertanto, che nelle prime 24 ore che seguono la macellazione, la refrigerazione non sia il fattore più importante per prevenire l'aumento delle cariche batteriche: le fasi precedenti, comprese tra il termine della macellazione e la refrigerazione (in particolare il sezionamento delle mezzene), potrebbero avere un'influenza più rilevante. I fattori che potrebbero aver inciso negativamente sulla qualità igienica delle cosce, che hanno presentato aumenti della CMT, potrebbero essere connessi alla mancata applicazione delle buone pratiche igieniche da parte del personale addetto al sezionamento. Infatti, l'aumento divergente della CMT rispetto alle Enterobacteriaceae potrebbe essere dovuto al fatto che le mani degli operatori sono contaminate, per la maggior parte, da una flora batterica specifica della cute, costituita essenzialmente da micrococchi, stafilococchi, batteri propionici e corynebatteri, microrganismi non facenti parte della famiglia Enterobacteriaceae (Aarnisalo *et al.*, 2006). Inoltre, diversi batteri sono in grado di aderire alle superfici a contatto con gli alimenti e successivamente contaminare i prodotti alimentari durante le operazioni di trasformazione. Le attrezzature e le superfici quindi possono rappresentare una importante fonte di contaminazione, qualora non venissero efficacemente pulite e sanificate o se fossero lasciate bagnate tra le operazioni di pulizia e l'uso successivo (Evans *et al.*, 2004).

L'eccezione è stata rappresentata dalla coscia n. 7, che ha fatto registrare i valori più elevati sia di temperatura iniziale che di abbattimento termico, sebbene rientri tra le cosce che hanno avuto un aumento della CMT e delle Enterobacteriaceae tra T_0 e T_{+24} . La curva di riduzione della temperatura della coscia n. 7, comunque, ha evidenziato una forte irregolarità e mostra forti oscillazioni di temperatura nel corso delle 24 ore, in controtendenza rispetto alle curve relative alle altre 14 cosce, caratterizzate da una spiccata linearità con un calo costante della temperatura. Per questo motivo, occorre sottolineare che la refrigerazione, seppure in questo studio non appaia come il fattore più determinante, riveste un'importanza strategica per contenere la moltiplicazione batterica. Questa considerazione è avvalorata dai risultati relativi alla coscia n. 7, per la quale il peggioramento delle condizioni igieniche può ritenersi imputabile ad una scorretta gestione della refrigerazione.

La refrigerazione può essere ritenuta, in definitiva, uno strumento indispensabile per prevenire la crescita dei batteri mesofili, patogeni, la germinazione delle spore e lo sviluppo dei microrganismi psicrotrofi, tanto che un controllo inadeguato della temperatura di raffreddamento viene indicato tra le cause più comunemente associate a malattie a trasmissione alimentare e al deperimento degli alimenti (CAC/RPC 58-2005; CAC/RPC 1-1969).

Bibliografia

- Aarnisalo K., Tallavaara K., Wirtanen G., Maijala R. e Raaska L. (2006). The hygienic working practices of maintenance personnel and equipment hygiene in the Finnish food industry. *Food Control*; **17** (2006):1001–1101.
- Berends B. R., Van Knapen F., Snijders J. M., Mossel D. A. (1997). Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. On pork carcasses. *Int. J. Food Microbiol.*; **36**: 199-206.
- Bolton D. J., Pearce R. A., Sheridan J. J., Blair I. S., McDowell D. A., Harrington D. (2002). Washing and chilling as critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point (HACCP) system. *J. App. Microbiol.*; **92**: 893-902.
- Bonardi S., Brindani F., Maggi E. (2002). Isolation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. From pigs at slaughter in Italy. *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma*; **vol. XXII**: 205-210.
- Bonardi S., Brindani F., Pizzin G., Lucidi L., D’Incau M., Liebana E., Morabito S. (2003). Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. *Int. J. Food Microbiol.*; **85** (1-2): 101-10.

- Borch E., Nesbakken T., Christensen H. (1996). Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *Food Microbiol.*; **30**: 9-25.
- CAC/RPC 1-1969. Recommended International Code of Practice; General Principles of Food Hygiene. *Rev.* 4-2003.
- CAC/RPC 58-2005. Code of hygienic practice for meat.
- CLSI, 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement, M100-S15. Wayne, PA: CLSI, 2006.
- CLSI, 2006a. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, tentative guideline, M31-A3, 3rd edn. Wayne, PA: CLSI, 2006.
- Cox J. (1999). *Salmonella*. In: Encyclopedia of Food Microbiology. Robinson R. K. Batt C. A. Patel P. D. (Eds.). Academic Press, London, 2000, pp.1928-1937.
- Decisione (CE) n. 55 del 20 Dicembre 2007. Decisione della Commissione relativa a un contributo finanziario della Comunità per un'indagine sulla diffusione della *Salmonella* spp. e dello *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente nei branchi di suini da riproduzione da realizzare negli Stati Membri (GUCE L. 14/10 del 17.01.2008).

- Decisione (CE) n. 471 del 2001. Decisione della Commissione dell'8 Giugno 2001 che fissa le norme per i controlli regolari delle condizioni igieniche generali, svolti dagli operatori negli stabilimenti conformemente alla direttiva 64/433/CEE sulle condizioni sanitarie per la produzione e l'immissione sul mercato di carni fresche e alla direttiva 71/118/CEE relativa a problemi sanitari in materia di scambi di carni fresche di volatili da cortile (GUCE n. L165 del 21.06.2001).
- Decisione (CE) n. 668 del 29 Settembre 2006. Decisione della Commissione relativa ad un contributo finanziario della Comunità per un'indagine di riferimento sulla diffusione della *Salmonella* nei suini da macello da realizzare negli Stati membri (GUCE L. 275/51 del 6.10.2006).
- Decreto Legislativo n. 31 del 02/02/2001. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano (GU Suppl. Ordin. 52 del 3.3.2001).
- Decreto Legislativo n. 196 del 04/04/2006. Attuazione della Direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici (GU Italiana n. 119 del 24.05.2006).
- Decreto Legislativo n. 193 del 06/11/2007. Attuazione della Direttiva CE n. 41 del 2004 relativa ai controlli in materia di

sicurezza alimentare e applicazione dei regolamenti comunitari nel medesimo settore (GU Suppl. Ordin. n. 261 del 09.11.2007).

- Determinazione Nazionale del 13/01/2005. Accordo, ai sensi dell'articolo 4 del decreto legislativo 28 agosto 1997, n. 281, tra il Ministero della Salute, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano sul documento concernente criteri per la predisposizione dei Piani di autocontrollo, per l'identificazione e la gestione dei pericoli nel settore delle carni (GU Suppl. Ordin. n. 32 del 09.02.2005).
- Determinazione Nazionale del 10/05/2007. Intesa, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 Giugno n. 131, tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano su "Linee guida relative all'applicazione del Regolamento CE della Commissione europea n. 2073 del 15 Novembre 2005 che stabilisce i criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari" (GU Suppl. Ordin. n. 124 del 30.05.2007).
- Direttiva (CE) n. 41 del 21/04/2004. Direttiva del Parlamento Europeo e del Consiglio del 21 Aprile 2004 che abroga alcune direttive recanti norme sull'igiene dei prodotti alimentari e le disposizioni sanitarie per la produzione e la commercializzazione di determinati prodotti di origine animale destinati al consumo umano e che modifica le direttive 89/662/CEE del Consiglio e 92/118/CEE e

la decisione 95/408/CE del Consiglio (GUCE n. L157 del 30.04.2004).

- Direttiva (CE) n. 83 del 03/11/1998. Direttiva del Consiglio del 3 Novembre 1998 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano (GUCE L330 del 5.12.1998).
- Direttiva (EC) n. 99 del 2003. Direttiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 Novembre 2003, sulle misura di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la direttiva 92/117/CEE del Consiglio (GUCE L. 325/31 del 12.12.2003).
- DPR n. 327 del 1980. Decreto del Presidente della Repubblica n. 327 del 26/03/1980. Regolamento di esecuzione della L. 30 Aprile 1962, n. 283, e successive modificazioni, in materia di disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande (GU Italiana n. 193 del 16.07.1980).
- EFSA 2006. European Food Safety Authority; Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on “Risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production”. *The EFSA Journal*; **341**: 1-131.
- EFSA 2008. European Food Safety Authority; Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the Baseline Survey on the Prevalence of *Salmonella* in Slaughter Pigs, in the EU,

2006-2007 – Part A: Salmonella prevalence estimates. *The EFSA Journal*; **135**: 1-111.

- EFSA 2009. European Food Safety Authority; Scientific report on Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in holdings with breeding pigs in the EU, 2008. Part A: Salmonella prevalence estimates. *EFSA Journal*; **7** (12): 1377-1470.
- EFSA 2011. EFSA Panels on Biological Hazards (BIOHAZ), on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), and on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (swine). *EFSA Journal*; **9** (10): 2351-2549.
- EFSA 2011a. European Food Safety Authority; Scientific report on technical specifications on harmonized epidemiological indicators for public health hazard to be covered by meat inspection of swine. *EFSA Journal*; **9** (10): 2371-2496.
- EFSA e ECDC 2011. European Food Safety Authority e European Centre for Disease Prevention and Control; The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal*; **9** (3): 2090-2468.
- EFSA e ECDC 2011. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union

Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. *EFSA Journal*; **9** (7): 2154-2475.

- EN/ISO 6579:2002/Amd 1:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. – Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage.
- Evans J. A., Russell S. L., James C., Corry J. E. L. (2004). Microbial contamination of food refrigeration equipment, *J. Food Engin.*; **62**: 225–232.
- Fabbi M., Andreoli G., De Giuli L., Carretto E. (2005). *Listeria monocytogenes*. In: Trattato sulle Infezioni e Tossinfezioni alimentari. Rondanelli E. G., Fabbi M., Marone P. (Eds.). Selecta Medica, Pavia, 2005, pp.357-389.
- Fosse J., Seegers H., Magras C. (2009). Prevalence and risk factors for bacterial food-borne zoonotic hazards in slaughter pigs: a review. *Zoonoses Public Health*; **56**: 429-454.
- Fredriksson-Ahomaa M., Gerhardt M., Stolle A. (2009). High bacterial contamination of pig tonsil at slaughter. *Meat Science*; **83**: 334-336.

- Gill C. O., Bryant J. (1993). The presence of *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* in pig carcass dehairing equipment. *Food Microbiol.*; **10**: 337-344.
- Hamilton D. R., Gallas P., Lyall L., Lester S., McOrist S., Hathaway S. C., Pointon A. M. (2002). Risk-based evaluation of postmortem inspection procedures for pigs in Australia. *Vet. Rec.*; **151** (4): 110-6.
- ISO 4833:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs- horizontal method for the enumeration of microorganisms- Colony count technique at 30 degrees C.
- ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs- General requirements and guidance for microbiological examinations.
- ISO 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- ISO 17604:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Carcass sampling for microbiological analysis.
- ISO 18593:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.

- ISO 21528-2:2004. Microbiology of food and animal feeding stuff- Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae- Part 2: Colony count method.
- Legge 283 del 1962. Legge ordinaria del Parlamento n. 283 del 30/04/1962, che modifica gli artt. 242, 243, 247, 250 e 262 del T. U. delle leggi sanitarie approvato con R. D. 27 Luglio 1934, n. 1265: Disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande (GU Italiana n. 04.06.1962).
- Mann J. E., Smith L., Brashears M. M. (2004). Validation of time and temperature values as critical limits for *Salmonella* and background flora growth during the production of fresh ground and boneless pork products. *J. Food Prot.*; **67** (7): 1389-93.
- Martin S. E. e Fisher C. W. (1999). *Listeria monocytogenes*. In: Encyclopedia of Food Microbiology. Robinson R. K. Batt C. A. Patel P. D. (Eds.). Academic Press, London, 2000, pp.1228-1237.
- Mousing J., Kyrval J., Jensen T. K., Aalbaek B., Buttenschøn J., Svensmark B., Willeberg P. (1997). Meat safety consequences of implementing visual postmortem meat inspection procedures in Danish slaughter pigs. *Vet. Rec.*; **140** (18): 472-7.
- Ottaviani F., Ottaviani M. (2005). Indicatori microbiologici di qualità e di salubrità degli alimenti. In: Trattato sulle Infezioni e

Tossinfezioni alimentari. Rondanelli E. G., Fabbi M., Marone P. (Eds.). *Selecta Medica*, Pavia, 2005, pp. 183-190.

- Pearce R. A., Bolton D. J., Sheridan J. J., McDowell D. A., Blair I. S., Harrington D. (2004). Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point system. *I. J. Food Microbiol.*; **90**: 331-339.
- Regolamento (CE) 178/2002. Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio del 28 Gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare (GUCE L del 1.2.2002).
- Regolamento (CE) 365 del 2010. Regolamento (UE) n. 365 della Commissione del 28 Aprile 2010, che modifica il Regolamento (CE) n. 2073 del 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari per quanto riguarda le enterobatteriacee presenti nel latte pastorizzato e in altri prodotti lattiero-caseari liquidi pastorizzati e *Listeria monocytogenes* nel sale alimentare (GUCE L. 107 del 29.04.2010).
- Regolamento (CE) 852/2004. Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 Aprile 2004, sull'Igiene dei prodotti alimentari (GUCE L 139 del 30.4.2004).

- Regolamento (CE) 853/2004. Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 Aprile 2004, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale (GUCE L 139/55 del 30.04.2004).
- Regolamento (CE) 854/2004. Regolamento 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 (GUCE L. 266/83 del 25.06.2004).
- Regolamento (CE) 882/2004. Regolamento CEE/UE n. 882 del 29 Aprile 2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangime e di alimenti alle norme sulla salute e sul benessere degli animali (GUCE n. L165 del 30.04.2004).
- Regolamento (CE) 1441 del 2007. Regolamento della Commissione del 5 Dicembre 2007 che modifica il Regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari (GUCE L. 322 del 07.12.2007).
- Regolamento (CE) 2073 del 2005. Regolamento della Commissione del 15 Novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari (GUCE L. 338 del 22.12.2005).

- Regolamento (CE) 2160 del 2003. Regolamento del Parlamento europeo e del Consiglio del 17 Novembre 2003 sul controllo della *Salmonella* e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti (GUCE L. 325 del 12.12.2003).
- Ricci A. (2005). Aspetti microbiologici ed epidemiologici delle salmonellosi in medicina veterinaria. In: Trattato sulle Infezioni e Tossinfezioni alimentari. Rondanelli E. G., Fabbi M., Marone P. (Eds.). Selecta Medica, Pavia, 2005, pp.283-299.
- Rondanelli M., Bonisio A., Giacosa A. (2005). Infezioni da Salmonelle in patologia umana. In: Trattato sulle Infezioni e Tossinfezioni alimentari. Rondanelli E. G., Fabbi M., Marone P. (Eds.). Selecta Medica, Pavia, 2005, pp.253-282.
- Thévenot D., Dernburg A., Vernozy-Rozand C. (2006). An update review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *J. Appl. Microbiol.*; **101**: 7-17.
- UNI EN ISO 6887-1:2000. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali. Preparazione dei campioni di prova, sospensione iniziale e diluizioni decimali per l'analisi microbiologica. Regole generali per la preparazione della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali.
- UNI EN ISO 11290 – parte 1:2005. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Listeria monocytogenes* – Parte 1: metodo per la ricerca.

- Jacxsens L., Kussaga J., Luning P. A., Van der Spiegel M., Devlieghere F., Uyttendaele M. (2009). A Microbial Assessment Scheme to measure microbial performance of Food Safety Management Systems. *Int. J. Food Microbiol.*; **134** (1-2):113-25.