

# **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI BIOMEDICINA COMPARATA E ALIMENTAZIONE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE INTERFACOLTA' IN BIOTECNOLOGIE PER LA  
SICUREZZA E L'IGIENE DEGLI ALIMENTI

TESI DI LAUREA

## **STUDIO SULLA CONTAMINAZIONE MICROBIOLOGICA DI CARNI MACINATE FRESCHE**

Relatore: Prof.ssa Antonella Caputo, Dipartimento di Medicina Molecolare

Correlatore: Dott.ssa Luisa Tomasi, Laboratorio Dedalo srl (VI)

Laureanda: Francesca Dal Prà

Matricola: 1035225 BAL

Anno accademico 2012/2013



*Ai miei genitori,*

*A Michele,*

*per esser stati un costante sostegno  
durante questo percorso.*



## ***Ringraziamenti***

*Desidero ringraziare la Prof.ssa Caputo, relatore di questa tesi, per la grande disponibilità e cortesia dimostratemi.*

*Un sentito ringraziamento va al laboratorio di ricerca e analisi Dedalo srl, al Dott. Renzo Padovan per avermi dato la possibilità di svolgere questa meravigliosa prima esperienza lavorativa e ai ragazzi dello staff (Paola, Elena, Gianluca, Alessandro, Giuseppe) per tutto quanto hanno fatto per me durante il periodo di stage.*

*Un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Luisa Tomasi e a Elisa per avermi seguita e aiutata in ogni momento e per avermi insegnato tantissime cose con pazienza ed entusiasmo. L'affetto e l'amicizia dimostratemi fa di voi oltre che due colleghe, due amiche che porterò nel cuore.*

*Un ultimo ringraziamento va a Giorgia e Giovanni, compagni di studi insostituibili.*



## SOMMARIO

RIASSUNTO.....	3
1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 Igiene degli alimenti.....	5
1.2 Malattie alimentari.....	7
1.2.1 <i>Salmonella spp.</i> .....	9
1.2.1.1 Sintomi.....	9
1.2.1.2 Modalità di trasmissione.....	10
1.2.1.3 Popolazione sensibile.....	11
1.2.1.4 Terapia.....	11
1.2.1.5 Prevenzione.....	12
1.2.1.6 Aspetti epidemiologici.....	13
1.2.2 <i>Escherichia coli</i> .....	16
1.2.2.1 I ceppi patogeni.....	17
1.2.2.2 La sintomatologia.....	18
1.2.2.3 Il trattamento.....	18
1.2.2.4 Sindrome emolitico-uremica.....	19
1.2.2.5 <i>Escherichia coli</i> O157.....	20
1.2.2.6 Aspetti epidemiologici.....	21
1.3 Regolamenti e normative.....	23
1.3.1 Il sistema HACCP.....	24
1.3.2 Il pacchetto igiene.....	27
1.3.3 Il regolamento 2073/2005 CE e s.m.i. (sue modifiche e integrazioni) (1441/2007/CE).....	28
2. SCOPO DELLA TESI.....	33
3. MATERIALI E METODI.....	35
3.1 Campionamento e preparazione dei campioni.....	35
3.1.1 Come eseguire il prelievo.....	35
3.1.2 Metodo tradizionale colturale.....	36
3.2 Metodica UNI EN ISO 16649-2:2001 per la conta di <i>Escherichia coli</i> $\beta$ - glucuronidasi-positivo.....	37
3.3 Metodica UNI EN ISO 4833:2004 per la conta di microorganismi.....	38
3.4 Metodica UNI EN ISO 6579:2008 per la ricerca di <i>Salmonella spp.</i> .....	40
4. RISULTATI.....	45
4.1 Controllo della qualità del dato nei metodi quantitativi.....	46
4.2 Calcolo dei risultati.....	48
5. CONCLUSIONI.....	55

APPENDICE A.....	59
APPENDICE B.....	63
BIBLIOGRAFIA .....	67



## RIASSUNTO

Con l'introduzione della pratica dell'autocontrollo, il responsabile dell'unità produttiva si deve assumere la responsabilità e l'obbligo di effettuare il monitoraggio continuo ed accurato del ciclo produttivo allo scopo di destinare alla commercializzazione e quindi al consumo un prodotto che sia contraddistinto non solo dalla necessaria sicurezza d'uso ma che risulti anche igienicamente affidabile <sup>1</sup>. La valutazione della "pericolosità reale" o "presunta" di un alimento può scaturire solo da un'accurata valutazione dei rischi a cui questo viene esposto nel corso di tutto il processo produttivo e distributivo. Il presente lavoro di tesi si è posto l'obiettivo di verificare se nei prodotti a base di carne macinata fresca, commercializzati da diverse macellerie ubicate in provincia di Vicenza, può essere garantito il corretto rispetto, da un lato dei criteri prioritari di sicurezza alimentare legati alla contaminazione da *Salmonella spp.* e dall'altro di igiene di processo valutabile attraverso l'eventuale presenza contaminante di cellule batteriche attive (CB = Carica Batterica) e, in particolare, di *Escherichia coli*. Dopo aver analizzato nel dettaglio il sistema di autocontrollo Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) approntato e utilizzato all'interno delle attività commerciali, verificando la corretta individuazione sia dei CCP (Critical Control Points) che delle conseguenti misure preventive/correttive, sono stati prelevati dei campioni di carne macinata, raccolti all'uscita della fase di macinazione, individuata come la più a rischio dell'intera catena produttiva, al fine di determinare l'eventuale presenza di problemi di sicurezza alimentare (contaminazione da *Salmonella spp.*) o di mancanza dei requisiti di igiene (CB = carica batterica e/o contaminazione da *E. coli*). Utilizzando la metodica analitica prevista dalle norme EN/ISO riportate nel Regolamento 2073/2005/CE e sue modifiche e integrazioni (s.m.i.), solo 3 campioni, dei 130 analizzati nell'arco di sei mesi, sono risultati positivi a *Salmonella spp.*. Per quanto riguarda invece l'igiene, i dati analitici raccolti (CB ed *E. coli*) sono stati confrontati con i corrispondenti valori limite di accettabilità: m = soglia al di sotto della quale tutti i risultati analitici vengono ritenuti soddisfacenti; M = soglia limite di accettabilità oltre la quale la partita in esame non può essere commercializzata. Partite con valori compresi nell'intervallo  $m \div M$  possono essere commercializzate, ma costituiscono un campanello d'allarme che invita ad un'ulteriore verifica dell'intero ciclo produttivo e delle sue modalità di gestione. Per quanto riguarda *E. coli*, sono stati individuati 3 campioni, su 130 analizzati, che esibivano una concentrazione superiore al limite inferiore m senza però superare quello

massimo M, mentre nessun campione analizzato presentava una concentrazione di *E. coli* superiore al limite massimo M. Per quanto riguarda invece la carica batterica mesofila (CB), sono stati individuati 44 campioni su 130 che esibivano una carica microbica superiore al limite inferiore m senza però superare quello massimo M e 23 campioni che superavano il livello massimo M previsto per legge. Questi risultati mettono in evidenza il basso livello di contaminazione dei campioni analizzati. In particolare, non risultano esserci problemi rilevanti a livello di sicurezza, in quanto il numero di campioni risultati positivi per la presenza di *Salmonella spp.* è esiguo, e di igiene di processo, per quanto riguarda il parametro *E. coli*, utilizzato come indice di contaminazione fecale, presente anch'esso in un numero bassissimo di campioni.

Diversa appare la situazione nel caso della carica batterica mesofila, altro indicatore di igiene di processo, con valori elevati in un maggior numero di campioni. A tale parametro, comunque, deve essere dato un peso diverso, in quanto, comprende specie per la maggior parte non pericolose per l'uomo che possono contaminare l'alimento per i motivi più disparati: carne in entrata, cattiva manipolazione, contaminazioni crociate, scarsa igiene degli ambienti, del personale e delle attrezzature.

**Parole chiave:**

Contaminazione microbiologica, carne macinata, sicurezza alimentare, igiene di processo, HACCP, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, carica batterica mesofila.

## **1. INTRODUZIONE**

### **1.1 Igiene degli alimenti**

Con il termine “igiene degli alimenti” s’intende quell’insieme di precauzioni che dovrebbero essere adottate durante la produzione, manipolazione e distribuzione degli alimenti affinché il prodotto destinato all’uomo sia soddisfacente, innocuo e salutare. Si prefigge di conservare le caratteristiche intrinseche di un alimento e di assicurarne l’innocuità. Quest’ultima caratteristica viene soddisfatta adottando misure atte ad evitare che un alimento possa esplicare un danno alla salute nel caso rappresenti un veicolo di germi patogeni o di sostanze tossiche.

I microrganismi pervengono sul cibo a seguito di una contaminazione e trovano in esso, ricco per sua stessa natura di sostanze nutritive, un ambiente adatto per svilupparsi e moltiplicarsi e di conseguenza, con il tempo e in condizioni ambientali adatte, determinano una serie di alterazioni. I fattori che condizionano la velocità di moltiplicazione dei batteri sono rappresentati, oltre che dalle caratteristiche proprie della matrice alimentare, dalle condizioni ambientali. Temperatura, pH, pressione osmotica, concentrazione salina, presenza o assenza di O<sub>2</sub> sono, infatti, determinanti affinché il microrganismo si possa riprodurre fino a raggiungere livelli di carica elevati.

La sicurezza alimentare è comunque un'emergenza permanente e una vera sfida; molteplici sono, infatti, i fattori di rischio e le occasioni di contaminazione. Le materie prime, sia di origine vegetale, che animale, possono essere veicolo di microrganismi patogeni, sostanze tossiche, residui di prodotti fitosanitari, farmaci, additivi, contaminanti ambientali come i metalli pesanti, micotossine, etc..<sup>2</sup>. Inoltre, occorre considerare anche alcuni cambiamenti culturali della società che hanno interessato il settore alimentare in questi ultimi anni, quali:

- ✓ La crescente frequenza dei pasti fuori casa, che costituisce un rischio sia per la particolare vulnerabilità dei cibi cotti nei riguardi di qualunque tipo di contaminazione microbica, sia per l'effetto moltiplicatore del danno che consegue all'elevato numero di consumatori di un cibo eventualmente contaminato;
- ✓ La globalizzazione dei mercati delle materie prime e dei prodotti alimentari, dove un errore o un abuso che coinvolga la sicurezza dei cibi può trasmettere il rischio a migliaia di chilometri di distanza con evidenti difficoltà d'individuazione e di

contenimento;

- ✓ La generale tendenza all'applicazione di tecnologie sempre meno drastiche, per ottenere prodotti più freschi, più nutrienti e più gustosi, rappresenta un ulteriore elemento di rischio. Se da una parte, infatti, con questi trattamenti si ottengono cibi più gustosi, dall'altra ne consegue una minore protezione da possibili contaminazioni e inquinamenti.

Per questa serie di motivi l'Unione Europea ha armonizzato fra gli stati membri le attività relative al controllo ufficiale dei prodotti alimentari, per prevenire rischi per la salute pubblica, proteggere i consumatori ed evitare frodi alimentari. In Italia il monitoraggio della sicurezza alimentare prevede il controllo ufficiale degli alimenti destinati sia al mercato nazionale, che internazionale. Le attività di controllo vengono effettuate lungo tutta la filiera produttiva, dalla produzione primaria, alla trasformazione, magazzinaggio, trasporto e commercio, fino alla somministrazione e al consumo. Prevedono accertamenti completi sul prodotto, attraverso ispezioni, campionamenti e analisi di laboratorio, nell'ambito dell'ambiente di produzione e sul personale addetto, nonché controlli sull'applicazione dei programmi di HACCP che le aziende predispongono per l'individuazione dei punti critici della catena produttiva. I settori maggiormente sottoposti a controllo e vigilanza sono quelli della ristorazione, della lavorazione delle carni e gli allevamenti, ma anche quello riguardante le farine con la produzione di pasta e pane.

I fattori favorevoli all'insorgenza di contaminanti alimentari sono:

- ✓ Scarsa igiene del personale;
- ✓ Consumo di alimenti crudi;
- ✓ Uso di alimenti avariati, insalubri e inadatti;
- ✓ Portatori sani;
- ✓ Manipolazione scorretta;
- ✓ Cottura e riscaldamento scorretti;
- ✓ Regimi di temperatura che permettono la crescita batterica;
- ✓ Sostanze chimiche negli alimenti;
- ✓ Attrezzature sporche;
- ✓ Contaminazioni crociate;
- ✓ Insetti e roditori;
- ✓ Conservazione scorretta degli alimenti pronti<sup>3</sup>.

E' molto importante perciò la corretta manipolazione degli alimenti da parte del personale responsabile della produzione, considerando che la maggior parte dei focolai di tossinfezioni alimentari sono conseguenti alla contaminazione dei prodotti proprio da parte degli operatori.

## **1.2 Malattie alimentari**

Attualmente, le malattie di origine alimentare costituiscono un rilevante problema di salute pubblica non solo nei paesi sottosviluppati, ma anche nei paesi ad elevato sviluppo socio-economico. Sono trasmesse da cibi o bevande contaminate da batteri patogeni, la cui presenza non sempre è legata ad alterazione visiva e organolettica. Molto spesso l'aspetto e il gusto dell'alimento, contaminato, ad esempio da Salmonella, non sono alterati; fattore questo che costituisce il reale pericolo per i consumatori.

Non tutti i microrganismi presenti negli alimenti sono dannosi per l'uomo, né provocano necessariamente il deterioramento dell'alimento stesso. Alcuni microrganismi fondamentali nei processi di fermentazione, quali batteri, lieviti e muffe, vengono normalmente utilizzati nelle lavorazioni industriali perché conferiscono al prodotto alcune caratteristiche particolari. Tra questi alimenti ritroviamo: vino, birra, yogurt, formaggi, etc..<sup>4</sup>.

I microrganismi possono essere distinti, in base al rapporto che instaurano con l'ospite, in saprofiti, se il loro habitat naturale è l'ambiente; commensali, quando vivono sui tegumenti (pelle, congiuntive, mucose dell'apparato respiratorio e genito-urinario); parassiti, quando sono in grado di aggredire l'ospite causandogli un danno, e infine patogeni opportunisti che sono in grado di recare danno all'ospite quando quest'ultimo si trova in particolari condizioni di recettività (maggiore suscettibilità alle infezioni), poiché non possiedono meccanismi d'azione patogena particolarmente aggressivi per cui solitamente non riescono a causare danni in soggetti sani e immunocompetenti<sup>3</sup>. Le malattie alimentari causate da microrganismi patogeni sono stati patologici che si manifestano in conseguenza al consumo di alimenti che possono contenere un microrganismo patogeno o una tossina di origine batterica.

Sotto il profilo pato-genetico, le malattie alimentari di origine microbica si possono suddividere in:

- ✓ Infezioni veicolate da alimenti;
- ✓ Intossicazioni alimentari;
- ✓ Tossinfezioni alimentari.

Le infezioni alimentari insorgono quando l'alimento consumato contiene batteri patogeni che colonizzano l'intestino dell'uomo, si sviluppano e causano lesioni ai tessuti. In generale, non è necessario che il batterio si moltiplichi nell'alimento, ma se ciò accade la probabilità d'infezione aumenta (è il caso ad esempio della salmonellosi, listeriosi e dell'enterite da *Campylobacter*).

Le intossicazioni alimentari, invece, insorgono in seguito al consumo di un alimento che contiene una tossina, come conseguenza di uno sviluppo microbico in quell'alimento. Il batterio può anche essere morto, ma la tossina è ancora attiva e permanente (è il caso ad esempio dell'intossicazione stafilococcica).

Infine, le tossinfezioni alimentari sono una combinazione delle due precedenti forme; il microrganismo patogeno deve raggiungere cariche molto elevate nell'alimento e dopo l'assunzione da parte dell'uomo, continua il suo sviluppo nell'intestino, liberando la tossina che scatena la sintomatologia <sup>3-5</sup>. In base al microrganismo responsabile, le tossinfezioni alimentari sono classificate in "classiche", ovvero causate da batteri quali *Salmonella spp.*, *Stafilococcus aureo* enterotossico, *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*; ed "emergenti", ovvero quelle i cui agenti causali sono stati individuati in tempi più recenti, come *Escherichia coli* enterotossigena, *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes*.

I fattori che contribuiscono all'emergenza sono:

- ✓ Cambiamenti nella demografia e nella condotta umana, nella tecnologia e industria, nel trasporto e commercio internazionale;
- ✓ L'adattamento microbiologico;
- ✓ Lo sviluppo economico;
- ✓ Il crollo delle misure adottate dalla sanità pubblica <sup>6</sup>.

Si avverte di conseguenza la necessità di adottare un programma di controllo e monitoraggio della produzione alimentare al fine di limitare i rischi di diffusione di queste patologie. Tale programma è conosciuto con il nome di sistema Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) <sup>3</sup>.

### 1.2.1 *Salmonella spp.*

Salmonella è un bacillo Gram-negativo, asporigeno, anaerobio facoltativo e appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Sono batteri mobili tranne *S. Gallinarum Pollorum* e possiedono flagelli peritrichi. Fermentano il glucosio, producendo gas (acido solfidrico), riducono i nitrati e non producono citocromo-ossidasi; la maggior parte delle Salmonelle non fermenta il lattosio.



Salmonella è uno degli agenti batterici più comunemente riscontrati in caso d'infezioni trasmesse per via alimentare, siano queste di tipo sporadico che epidemico. Salmonella è stata segnalata per la prima volta nel 1886, in un caso di peste suina, dal medico americano Daniel Elmer Salmon. E' presente in natura con più di 2000 varianti (i cosiddetti sierotipi) ma i ceppi più frequentemente diffusi nell'uomo e nelle specie animali, in particolare in quelle allevate per la catena alimentare, sono *S. enteritidis* e *S. typhimurium*. Le infezioni provocate da Salmonella si distinguono in forme tifoidee, associate a *S. typhi* e *S. paratyphi*, responsabili della febbre tifoide e delle febbri enteriche in genere per le quali l'uomo rappresenta l'unico serbatoio del microorganismo, e forme non tifoidee, causate dalle cosiddette Salmonelle minori, quali *S. typhimurium* e la *S. enteritidis*, responsabili di forme cliniche a prevalente manifestazione gastroenterica. Le salmonelle non tifoidee, responsabili di oltre il 50% del totale delle infezioni gastrointestinali, sono una delle cause più frequenti di tossinfezioni alimentari nel mondo industrializzato. Le infezioni da *Salmonella spp.* possono verificarsi nell'uomo, negli animali domestici, da cortile (polli, maiali, bovini, roditori, cani, gatti, pulcini) e selvatici, compresi i rettili domestici (iguane e tartarughe d'acqua). I principali serbatoi d'infezione sono rappresentati dagli animali; i loro derivati (come carne, uova e latte consumati crudi o non pastorizzati) e l'ambiente (acque non potabili) rappresentano i veicoli di infezione.

#### 1.2.1.1 Sintomi

La gravità dei sintomi varia dai semplici disturbi del tratto gastrointestinale (febbre, dolore addominale, nausea, vomito e diarrea) fino a forme cliniche più gravi (batteriemie o infezioni

focali a carico per esempio di ossa e meningi) che si verificano soprattutto in soggetti a rischio (anziani, bambini e individui con deficit a carico del sistema immunitario). I sintomi possono comparire tra le 6 e le 72 ore dall'ingestione di alimenti contaminati (ma più comunemente si manifestano dopo 12-36 ore) e si protraggono per 4-7 giorni. Nella maggior parte dei casi la malattia ha un decorso benigno e non richiede l'ospedalizzazione, ma talvolta l'infezione può aggravarsi al punto tale da rendere necessario il ricovero. La salmonellosi nell'uomo può causare anche lo stato di portatore asintomatico.

### **1.2.1.2 Modalità di trasmissione**

I principali veicoli di trasmissione della Salmonella sono rappresentati da:

- ✓ Alimenti;
- ✓ Acqua contaminata;
- ✓ Piccoli animali domestici.

L'infezione si trasmette per via oro-fecale, attraverso l'ingestione di cibi o bevande contaminate o per contatto, attraverso la manipolazione di oggetti o piccoli animali in cui siano presenti i batteri. Gli alimenti contaminati rappresentano i veicoli più importanti di diffusione dell'infezione nell'uomo. Tuttavia, per poter causare la malattia è necessaria la colonizzazione massiva dell'alimento da parte dell'agente patogeno prima che venga ingerito. Solitamente all'apparenza il cibo contaminato non presenta alcuna alterazione delle caratteristiche organolettiche (colore, odore, sapore, consistenza).

La contaminazione degli alimenti può avvenire al momento della loro produzione, durante la preparazione, oppure dopo la cottura a causa di una manipolazione non corretta.

In particolare, sono da considerarsi alimenti a rischio:

- ✓ Uova crude (o poco cotte) e derivati a base di uova;
- ✓ Latte crudo e derivati del latte crudo (compreso il latte in polvere);
- ✓ Carne e derivati (specialmente se poco cotti o crudi);
- ✓ Salse e condimenti per insalate;
- ✓ Preparati per dolci e creme;
- ✓ Gelato artigianale e commerciale;
- ✓ Frutta e verdura (angurie, pomodori, germogli di semi, meloni, insalata, sidro e succo d'arancia non pastorizzati), contaminate durante il taglio.



Veicoli d'infezione sono anche superfici e utensili, e qualsiasi alimento manipolato da persone infette, con scarsa attenzione all'igiene personale.

### **1.2.1.3 Popolazione sensibile**

Sono particolarmente suscettibili all'infezione da Salmonella i soggetti:

- ✓ Affetti da acloridria (disfunzione dell'apparato digerente, consistente nell'assenza di acido cloridrico nel succo gastrico) e da malattie neoplastiche;
- ✓ In terapia con farmaci anti-acido, in progressa o concomitante terapia antibiotica ad ampio spettro, e/o in terapia immunosoppressiva;
- ✓ Che hanno subito interventi chirurgici a carico dell'apparato gastrointestinale.

La gravità della malattia è in relazione al sierotipo infettante, al numero di microrganismi ingeriti e a fattori di resistenza del paziente. In particolare, a livelli di acidità gastrica ridotti corrispondono maggiori probabilità di manifestare diarrea. Ai germi che non vengono neutralizzati dalla secrezione acida dello stomaco l'intestino umano risponde con una reazione infiammatoria che provoca il fenomeno diarroico. Soggetti a rischio sono anziani, bambini e donne in gravidanza, ma anche individui affetti da anemia falciforme e HIV. Per questi ultimi l'infezione da Salmonella si manifesta anche con ricorrenti episodi di setticemia non tifoidea.

### **1.2.1.4 Terapia**

Nella maggior parte dei casi, l'infezione da salmonella si presenta in forma lieve e si risolve da sola nel giro di pochi giorni. In questi casi il consiglio è di non contrastare il fenomeno diarroico, poiché è il naturale meccanismo di difesa usato dall'organismo per espellere i germi. Di norma per la salmonella è sufficiente adottare una terapia di supporto: somministrazione di soluzioni orali reidratanti (che servono per compensare l'acqua e i sali persi con il vomito e la diarrea), fermenti lattici e probiotici. Nonostante la salmonella sia un'infezione batterica, il ricorso agli antibiotici viene sconsigliato, poiché potrebbe allungare i tempi di persistenza delle salmonelle nelle feci o indurre resistenza. L'ospedalizzazione e l'uso di antibiotici sono indicati solo nei casi gravi (con sintomi extraintestinali), nei neonati al di sotto dei 3 mesi di età e in soggetti con malattie cronico-degenerative.

### 1.2.1.5 Prevenzione

Importanti misure di prevenzione includono l'utilizzo di norme igieniche di base che possono risultare molto efficaci e si basano su semplici precauzioni di ordine igienico sanitario e comportamentale. A causa della grande varietà di salmonelle non-tifoidee esistenti, non è stato ancora possibile mettere a punto un vaccino. Per quanto riguarda le norme igieniche da rispettate dal punto di vista alimentare, va ricordato che i batteri della Salmonella sono facilmente eliminabili attraverso una buona cottura, ma pochi sanno che l'effetto sterilizzante del calore di cottura delle carni si annulla se, per esempio, il coltello usato per tagliare la carne cruda viene impiegato poco dopo per tagliare la carne cotta, senza un adeguato lavaggio tra un'operazione e l'altra. Altrettanto pericolosa è l'abitudine di rompere le uova sottovalutando la potenziale carica infettiva del guscio. È bene rammentare che piccole incrinature nel guscio possono permettere l'ingresso nell'uovo del batterio eventualmente presente nelle feci della gallina. Nel mondo, si stima che il 50% delle epidemie di salmonellosi sia dovuto a uova contaminate, mentre la carne bovina e suina (consumata cruda o poco cotta) e i derivati del latte possono provocare, rispettivamente, il 15% e il 5% dei casi. In linea generale, per diminuire il rischio di salmonellosi, si consiglia di:

- ✓ Lavare la frutta e la verdura prima della manipolazione e del consumo;
- ✓ Sanificare tutti gli utensili e i macchinari usati per la produzione di alimenti;
- ✓ Lavare le mani prima, durante e dopo la preparazione degli alimenti;
- ✓ Refrigerare gli alimenti preparati in piccoli contenitori, per garantire un rapido abbattimento della temperatura;
- ✓ Cuocere tutti gli alimenti derivati da animali, soprattutto pollame, maiale e uova;
- ✓ Proteggere i cibi preparati dalla contaminazione di insetti e roditori;
- ✓ Evitare (o perlomeno ridurre) il consumo di uova crude o poco cotte, di gelati e zabaioni fatti in casa, o altri alimenti preparati con uova sporche o rotte;
- ✓ Consumare solo latte pastorizzato;
- ✓ Evitare le contaminazioni tra cibi, avendo cura di tenere separati i prodotti crudi da quelli cotti;
- ✓ Evitare che persone con diarrea preparino alimenti destinati alla ristorazione collettiva e assistano soggetti a rischio (bambini, anziani, ammalati).

### 1.2.1.6 Aspetti epidemiologici

La salmonellosi è una malattia diffusa in tutto il mondo, responsabile della maggior parte degli episodi di tossinfezione alimentare nei Paesi Occidentali. L'infezione da *Salmonella* può dar luogo a episodi epidemici sia quando si concentrano più soggetti in uno stesso luogo (per esempio scuole, ospedali, case di riposo), sia quando soggetti diversi hanno accesso alle stesse fonti alimentari (per esempio mense, ristoranti). Gli episodi di salmonellosi si verificano generalmente in piccoli focolai, ma più spesso si tratta di casi sporadici. Grandi focolai sono stati riscontrati in ospedali, istituti per l'infanzia, ristoranti e case di riposo.

In Europa dal 1980 è attivo un sistema di sorveglianza coordinato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) che prevede la raccolta di dati epidemiologici sulle tossinfezioni alimentari nell'uomo da 49 Paesi membri dei 51 facenti parte della Regione Europea dell'OMS. Il progetto produce un rapporto biennale e una newsletter trimestrale. Nel 1994, allo scopo di descrivere il fenomeno della diffusione di *Salmonella spp.* e di altri patogeni enterici in Europa (*E. coli* 0157 e altri *E. coli* produttori di verocitotossina VTEC) e di coordinare l'attività dei sistemi nazionali, è nato un sistema di sorveglianza denominato Enter-net di cui fanno parte 23 Paesi Europei e 3 Paesi non Europei. Lo scopo del sistema è ottenere dati descrittivi sugli isolamenti di *Salmonella spp.* e di descrivere la frequenza dei sierotipi e di altre caratteristiche (fagotipi, profilo di antibiotico resistenza, etc..) degli stipiti isolati. Inoltre, il sistema di sorveglianza, basandosi sulla tipizzazione molecolare dei ceppi isolati, permette di confrontare i risultati tra i diversi Paesi partecipanti, in caso di episodi epidemici transnazionali. Nel 2006, secondo il Rapporto annuale sull'epidemiologia delle malattie infettive trasmissibili dall'animale all'uomo nell'Unione Europea, pubblicato dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (Efsa) in collaborazione con il Centro europeo per il controllo delle malattie (Ecdc), *Salmonella spp.* risulta essere la seconda causa di tossinfezioni alimentari in Europa, dopo *Campylobacter*. La tendenza generale indica una diminuzione nel numero dei casi d'infezione da *Salmonella spp.*, passati dai circa 196.000 casi confermati del 2004 ai 160.000 del 2006, con una riduzione complessiva del 18,1%. Nel 2006, come per gli anni precedenti, i sierotipi più frequentemente isolati nell'uomo sono stati *S. enteritidis* e *S. typhimurium*<sup>7</sup>. Nonostante la riduzione osservata negli ultimi anni, le infezioni da *Salmonella spp.* sono un problema di sanità pubblica importante, soprattutto se si tiene conto che il dato relativo alle tossinfezioni alimentari, registrato dai vari sistemi di sorveglianza nazionale, è sottostimato dal problema della sottotifica.

In Italia la salmonellosi è una malattia soggetta a notifica obbligatoria inserita nella Classe II di notifica delle malattie infettive <sup>8</sup>. Parallelamente, l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) coordina il sistema Enter-net Italia che si avvale della partecipazione di 29 laboratori diagnostici che operano nel settore della microbiologia clinica. Ogni anno vengono segnalati al sistema, in media, 5500 sierotipi nell'uomo. Il sistema di sorveglianza Enter-net Italia raccoglie, inoltre, gli isolamenti di *Salmonella spp.* da fonti ambientali. Queste segnalazioni provengono dalle Agenzie regionali per la protezione ambientale (Arpa) presenti sul territorio. Secondo i dati forniti da Enter-net Italia e pubblicati sul Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità, nel 2006 sono stati segnalati 3576 ceppi di *Salmonella* isolati da casi d'infezione umana. Come negli anni precedenti, si conferma anche nel 2006 la riduzione del numero totale degli isolamenti umani di *Salmonella* e la significativa diminuzione degli isolamenti di *S. enteritidis* nonostante alcuni episodi epidemici legati alla ristorazione collettiva. Si è osservato, infatti, un netto calo di casi di *S. Enteritidis* passati da 2287 nel 2003, a 1648 nel 2004, a 1018 nel 2005 fino ad arrivare ai 994 casi segnalati nel 2006. *S. enteritidis* e *S. typhimurium* sono i sierotipi prevalenti, e rappresentano circa l'80% di tutti i casi di infezione verificatisi negli ultimi dieci anni. Il sierotipo più diffuso in Italia è rappresentato da *S. typhimurium*, al contrario del resto d'Europa dove il sierotipo più frequente è *S. enteritidis*. La distribuzione delle segnalazioni a livello territoriale, come per gli anni precedenti, non è stata uniforme (**Tabella 1**). Il 64,3% degli isolamenti è stato riportato dalle Regioni del Nord Italia, il 28,7% dal Centro, il restante 7% dal Sud.

Tabella 1  
 Numero degli isolamenti di *Salmonella spp.* da fonte umana per Regione, anni 2005-2006.

Regione	2005		2006	
	n. ceppi	Tassi x 100.000	n. ceppi	Tassi x 100.000
Abruzzo	1	0,08	0	0
Basilicata	0	0	0	0
Calabria	1	0,05	0	0
Campania	0	0	0	0
Emilia-Romagna	346	8,71	389	9,76
Friuli-Venezia Giulia	306	25,85	1	0
Lazio	462	9,04	438	8,56
Liguria	21	1,34	53	3,37
Lombardia	717	7,94	657	7,27
Marche	241	16,39	158	10,74
Molise	69	21,52	50	15,59
PA Bolzano	59	12,74	129	27,86
PA Trento	186	39,2	170	35,63
Piemonte	688	16,32	489	11,6
Puglia	174	4,33	164	4,07
Sardegna	48	2,94	85	5,2
Sicilia	221	4,45	0	0
Toscana	20	0,57	173	4,94
Umbria	222	26,88	208	25,18
Valle D'Aosta	0	0	0	0
Veneto	619	13,67	412	9,09
Totale	4.401	7,72	3.576	6,27

La **Tabella 2** riporta la distribuzione degli isolamenti di *Salmonella spp.* per classe di età e mostra come la gran parte degli isolamenti riguardi i bambini tra 1 e 5 anni di età. Rispetto

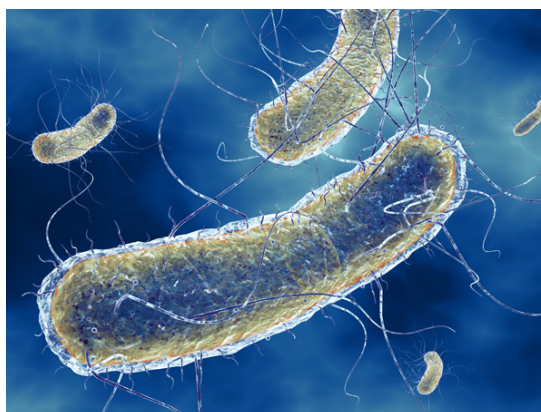
all'anno precedente, la percentuale di segnalazioni che non riporta l'informazione sull'età si è notevolmente ridotta (34% verso 3,3%)<sup>9</sup>.

Tabella 2  
Distribuzione degli isolamenti umani di *Salmonella* spp. per classe d'età.

Classe di età	Isolamenti	%
0 - 11 mesi	157	4,4
1 - 5 anni	1130	31,6
6 -14 anni	863	24,1
15 - 64 anni	918	25,7
oltre i 65 anni	388	10,9
non noto/dato mancante	120	3,3
Totale	3.576	100

### 1.2.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* è un batterio gram-negativo, appartenente al genere *Escherichia*. Ne esistono centinaia di sierotipi che si caratterizzano per le diverse combinazioni degli antigeni O, H, K e F. Poiché la sua temperatura ottimale di sopravvivenza è di 37 °C, *E. coli* vive facilmente nell'intestino dell'uomo e degli animali; è poco resistente a disinfettanti chimici e/o fisici e viene



distrutto con la pastorizzazione. Alcuni ceppi di *E. coli* sono patogeni; essi, infatti, sono dotati di fattori di virulenza e sono associati a determinate patologie, sia intestinali che extraintestinali. I ceppi di *E. coli* associati a patologie enteriche sono i seguenti:

- ✓ *E. coli* enterotossigeno (ETEC);
- ✓ *E. coli* enteroinvasivo (EIEC);
- ✓ *E. coli* enteropatogeno (EPEC);

- ✓ *E. coli* enteroaderente (EAEC);
- ✓ *E. coli* produttore di verocitotossine (VTEC) o anche shigatossine (STEC).

Un importante sottogruppo degli *E. coli* produttori di verotossine sono gli *E. coli* enteroemorragici (EHEC). I ceppi che sono alla base delle diverse forme enteriche possono sviluppare il proprio potere patogeno seguendo strade diverse, possono farlo producendo enterotossine e/o citotossine, invadendo la mucosa intestinale oppure, dopo aver aderito agli enterociti, inviando, attraverso la membrana, dei segnali biochimici che sono in grado di sovvertire l'organizzazione citoscheletrica.

### 1.2.2.1 I ceppi patogeni

Gli ETEC (*E. coli* enterotossigeni) sono provvisti di appendici proteiche, dette *adesine fimbriali*, che permettono loro l'adesione all'epitelio dell'intestino tenue; questo ceppo di *E. coli* produce varie tipologie di enterotossine; alcuni ceppi producono tossine termolabili, altri producono tossine termostabili, mentre altri ceppi le producono entrambe. I processi infettivi provocati dagli *E. coli* enterotossigeni sono endemici nei Paesi in via di sviluppo e colpiscono solitamente i bambini al momento dello svezzamento, nonché i viaggiatori che provengono dai Paesi maggiormente sviluppati, rappresentando la principale causa della cosiddetta “diarrea del viaggiatore”. La principale fonte di contagio è rappresentata da acque contaminate con deiezioni umane e/o animali. Gli EIEC (*E. coli* enteroinvasivi) invadono le cellule della mucosa del colon sfruttando un meccanismo noto come *endocitosi*; sono causa di danno tissutale, infiammazione e necrosi; generalmente l'infezione da EIEC è caratterizzata dalla presenza di diarrea acquosa con sangue, muco e leucociti, e febbre. Gli EPEC (*E. coli* enteropatogeni) aderiscono all'epitelio dell'intestino tenue provocando la distruzione dei microvilli intestinali e causando diarrea (in particolar modo nei lattanti e nei bambini), vomito e febbre non particolarmente elevata; insieme agli ETEC sono l'agente causale di diarrea più frequente a livello mondiale. Gli EPEC sono i primi ceppi del batterio a essere stati identificati come patogeni intestinali; la loro trasmissione avviene generalmente attraverso la via oro-fecale. Gli EAEC (*E. coli* enteroaderenti) aderiscono al piccolo intestino secernendo enterotossine e citotossine e sono stati isolati solamente in casi pediatrici. L'ultimo gruppo (*E. coli* produttori di verocitotossine) è quello che negli ultimi anni ha assunto maggiore importanza come causa della colite emorragica e della sindrome emolitico-uremica (la prima rilevazione è del 1982 in circa 50 soggetti che avevano mangiato hamburger contaminati).

L'infezione da *E. coli* VTEC viene trasmessa dagli alimenti per via oro-fecale e particolare attenzione va posta nell'uso di carne di manzo cruda o poco cotta. Altri alimenti a rischio sono il latte non pastorizzato e gli ortaggi irrigati con acqua contaminata dagli escrementi del bestiame.

### **1.2.2.2 La sintomatologia**

I sintomi che caratterizzano le infezioni da *E. coli* variano da soggetto a soggetto e, ovviamente, dal sierotipo contaminante. Nelle infezioni da *E. coli* enterotossigeni la sintomatologia, compare fra le 8 e le 48 ore dall'ingestione dei cibi contaminati ed è caratterizzata da malessere generale, nausea, diarrea acquosa e crampi addominali. Nelle infezioni da *E. coli* enteroinvasivi i sintomi compaiono nel giro di 8-24 ore circa; il soggetto avverte brividi, febbre, mal di testa ed è colpito da diarrea profusa e disidratazione. Caratteristica tipica dell'infezione da EIEC è il rinvenimento nelle feci di una notevole quantità di leucociti. Le infezioni da *E. coli* enteropatogeni sono rare nei soggetti adulti; più frequentemente si registrano nei bambini ospedalizzati. In un soggetto adulto queste infezioni sono generalmente legate all'ingestione di acqua contaminata. I sintomi (vomito, febbre, dolori addominali e diarrea mucosa persistente) compaiono in un periodo di tempo compreso fra le 16 e le 72 ore. Le infezioni da *E. coli* enteroaderenti sono generalmente caratterizzate da diarrea; queste forme si riscontrano soprattutto nei bambini che vivono nei Paesi in via di sviluppo. Le infezioni da *E. coli* produttori di verocitotossine sono in grado di causare gravi avvelenamenti nell'essere umano. A questo gruppo appartiene il sottogruppo degli *E. coli* enteroemorragici. La maggior parte dei casi d'infezioni sono causati dal sierotipo O157:H7; la principale fonte di trasmissione di questo ceppo è il bestiame da allevamento, ma esso è presente anche in vari animali domestici e nei mammiferi selvatici. I sintomi dell'infezione da *E. coli* O157:H7 sono rappresentati principalmente da diarrea sanguinolenta grave. In circa il 6% dei casi, la patologia si complica evolvendo nella sindrome emolitico-uremica (SEU), dovuta al passaggio in circolo della tossina.

### **1.2.2.3 Il trattamento**

L'infezione si potrebbe facilmente prevenire con una maggiore igiene e soprattutto con la conoscenza degli alimenti a rischio. Il fatto che tutto spesso si riduca a qualche giorno di forte diarrea, non deve far passare in secondo piano che l'esito della tossinfezione può essere



mortale in una certa percentuale di casi (per fortuna bassa, ma non trascurabile). Poiché gli antibiotici sembrano addirittura peggiorare la situazione, le cure sono sintomatiche (reidratazione) e volte a curare o prevenire le complicanze.

#### **1.2.2.4 Sindrome emolitico-uremica**

La sindrome emolitico-uremica (SEU) è una malattia rara che si osserva soprattutto negli anziani e nei bambini, in particolare nei primi anni di vita. È caratterizzata dalla comparsa di tre sintomi tipici: anemia emolitica microangiopatica, piastrinopenia (ridotto numero di piastrine) e insufficienza renale acuta a causa della quale molto spesso è necessario ricorrere alla dialisi. Nei bambini la SEU può avere un decorso grave fino ad essere, talvolta, mortale. Nell'80-90% dei casi la SEU è una complicanza di un'infezione intestinale batterica, sostenuta da ceppi di *Escherichia coli* produttori di una potente tossina, detta verocitotossina o Shiga-tossina (VTEC), e trasmessa per via alimentare o oro-fecale. Generalmente, i casi di SEU si presentano in forma sporadica. Focolai epidemici possono manifestarsi sia in ambito familiare che in comunità (asili nido, scuole, ecc) e sono riconducibili all'esposizione a fonti comuni di infezione da VTEC. Nelle forme tipiche, l'infezione esordisce con diarrea, spesso emorragica, vomito e intenso dolore addominale anche se nelle fasi precoci la diarrea è del tutto aspecifica e talvolta può mancare. Se l'infezione evolve verso la SEU, si manifestano i sintomi e i segni clinici riconducibili all'insufficienza renale (oliguria, anuria), all'anemia acuta e alla trombocitopenia. Nei casi più gravi possono comparire manifestazioni di carattere neurologico come confusione, obnubilamento sensorio e convulsioni. La diagnosi da SEU si basa sulla sintomatologia clinica, sulla valutazione dei parametri ematologici e di funzionalità renale. Anche se non compaiono i sintomi precoci riconducibili a un'enterite, in presenza dei sintomi tipici della SEU va sempre sospettata l'infezione da VTEC, diagnosticabile attraverso metodiche speciali, non eseguite di routine dai laboratori microbiologici ospedalieri. In fase acuta, i test rilevano la tossina circolante; più tardivamente si può, invece, ricorrere alla diagnosi sierologica basata sul rilevamento di anticorpi sierogruppo-specifici. Il decorso della SEU può essere assai rapido e pertanto è molto importante intervenire tempestivamente ricorrendo a centri ospedalieri specializzati, in grado di fornire un'adeguata terapia. Durante la fase d'insufficienza renale è, infatti, indispensabile il ricovero presso un centro specializzato in nefrologia che possa garantire la dialisi e la plasmateresi. Va sottolineato che la terapia antibiotica non è necessaria e può perfino risultare dannosa poiché potrebbe favorire, da parte dei VTEC, la liberazione intestinale e l'azione sistemica della tossina. E' invece opportuno

monitorare la funzione renale dei pazienti con sospetta infezione intestinale da VTEC poiché a rischio di sviluppare la SEU. La chiave per la prevenzione della SEU è evitare l'esposizione alle possibili fonti d'infezione da VTEC.

Come per le altre infezioni trasmesse da alimenti o per via oro-fecale è quindi necessario:

- ✓ Evitare il consumo di carne poco cotta, specialmente se macinata, e di latte non pastorizzato o suoi derivati (ad esempio formaggi freschi da latte non pastorizzato);
- ✓ Evitare in cucina la contaminazione di alimenti pronti per il consumo (come insalate, etc..) con carne cruda, per esempio usando lo stesso coltello o lo stesso tagliere;
- ✓ Evitare il contatto con le feci dei ruminanti e con acque e suolo contaminati da queste;
- ✓ Come per altre infezioni intestinali, è opportuno allontanare le persone con diarrea, soprattutto bambini, dalla comunità fino a risoluzione dell'episodio. Qualora si abbia un caso d'infezione intestinale da VTEC, soprattutto se si tratta di un bambino, sia il paziente, che i suoi familiari devono osservare attente norme igieniche;
- ✓ Le normali operazioni di pulizia ambientale e di igiene personale (il lavaggio delle mani) sono sufficienti a evitare la diffusione dell'infezione.

#### **1.2.2.5 *Escherichia coli* O157**

L'infezione da *Escherichia coli* produttore di verocitotossina (VTEC) è considerata una zoonosi poiché il tratto gastro-intestinale dei ruminanti, in particolare dei bovini e bufalini, costituisce il serbatoio naturale di questi batteri. *E. coli* O157 viene incluso tra gli agenti di tossinfezione alimentare, anche se l'epidemiologia delle infezioni da VTEC, rispetto alle più classiche tossinfezioni, presenta alcuni caratteri distintivi. La trasmissione all'uomo avviene prevalentemente per via alimentare, attraverso l'ingestione di derrate di origine animale contaminate in fase di produzione o lavorazione (carni contaminate e non sottoposte a cottura completa, latte crudo, latticini non pastorizzati) ma anche attraverso ortaggi e frutti coltivati su terreni fertilizzati o irrigati con reflui da allevamenti bovini infetti. Tra le potenziali fonti d'infezione, un ruolo sempre più importante viene attribuito alle fonti idriche, siano esse destinate a usi civili, agricoli o per balneazione. Infine, il contatto diretto con animali appartenenti alle specie serbatoio e la trasmissione persona-persona (per via oro-fecale) possono giocare un ruolo nella propagazione dell'infezione. Il periodo di incubazione

dell'infezione da VTEC è compreso tra 1 e 5 giorni. Esistono numerosi sierogruppi VTEC dei quali il più conosciuto e diffuso è *E. coli* O157. Nel nostro Paese sono molto frequenti anche i sierogruppi O26, O111 e O145. Le indagini microbiologiche per la ricerca dei VTEC richiedono tecniche speciali che generalmente non sono disponibili presso i laboratori clinici e ospedalieri. In commercio esistono terreni selettivi/differenziali e test di agglutinazione per *E.coli* O157 che possono permetterne una prima identificazione. I ceppi così identificati devono essere confermati da un laboratorio di riferimento, verificando la capacità del ceppo di produrre la tossina (test di citotossicità su colture cellulari) e/o la presenza dei geni codificanti per la tossina stessa. L'ISS coordina dal 1988 un sistema di sorveglianza delle infezioni da VTEC e la rete italiana del sistema di sorveglianza europeo Enter-Net, alla quale fanno capo i laboratori di riferimento presenti sul territorio nazionale.

#### **1.2.2.6 Aspetti epidemiologici**

Le infezioni causate da ceppi di *E. coli* enteroemorragici produttori di verocitotossina costituiscono un problema di sanità pubblica in tutto il mondo industrializzato. Negli USA, si stima che questi batteri causino circa 100.000 infezioni e 90 decessi ogni anno. Questi microrganismi sono stati implicati in gravi epidemie di origine alimentare in Nord America, Europa, Australia e Giappone. Tutti questi episodi epidemici hanno coinvolto un gran numero di persone con un pesante impatto sull'opinione pubblica e hanno visto implicati carni poco cotte, latte non pastorizzato e vegetali da consumare crudi, come germogli, lattuga e spinaci. In Europa, la più alta incidenza d'infezione da *E.coli* O157 si registra in Gran Bretagna, con importanti epidemie quali quella verificatasi in Scozia nel 1996, con circa 500 casi e 20 decessi in maggioranza tra soggetti anziani. In Europa continentale le infezioni causate da VTEC appartenenti a sierogruppi diversi dall'O157, definiti nel loro insieme "non-O157", sembrano essere più frequenti che in Gran Bretagna e Nord America. Inoltre, la frequenza di episodi epidemici e gli studi epidemiologici sull'incidenza della sindrome emolitico-uremica (SEU), la manifestazione clinica più grave e caratteristica delle infezioni da EHEC, suggeriscono l'esistenza di una diversa distribuzione geografica, con un'incidenza delle infezioni più alta nell'Europa centrale rispetto ai paesi Scandinavi e al bacino del Mediterraneo. Più scarse sono le informazioni disponibili sulla situazione in Europa orientale. Nell'Unione Europea, nel 2008, un totale di 3.159 notifiche d'infezione da VTEC e 146 casi di SEU sono stati segnalati al Centro europeo per il controllo delle malattie (ECDC) e inclusi nella relazione congiunta EFSA-ECDC sulle zoonosi. Tuttavia, queste cifre potrebbero

rappresentare una sottostima della vera incidenza, in quanto, in molti paesi dell'UE non vi è l'obbligo di notifica della SEU e la diagnosi di laboratorio delle infezioni è problematica. Pertanto, la reale incidenza della SEU, così come il numero di infezioni da VTEC può essere sottostimato, e il reale peso delle malattie correlate ai VTEC rimane ancora sconosciuto <sup>10</sup>.

### 1.3 Regolamenti e normative

In questi ultimi anni il settore alimentare è stato coinvolto in diverse crisi (BSE, diossina, influenza aviaria, etc..) e ciò ha portato il tema della sicurezza alimentare al centro dell'attenzione generale. L'aumento dell'interesse dei consumatori verso la salubrità degli alimenti ha indotto la Commissione Europea e, sul piano nazionale, il Ministero della Salute, a considerare come priorità strategica il raggiungimento degli standard più elevati possibili di sicurezza alimentare.

La strada da percorrere a tale scopo si snoda attraverso varie tappe:

- ✓ L'applicazione del nuovo quadro giuridico del settore alimentare, che riflette la politica del "from farm to fork" andando a coprire l'intera catena alimentare;
- ✓ L'applicazione di adeguate procedure per la valutazione del rischio sia da parte dell'operatore alimentare, che dell'organo di controllo;
- ✓ L'attribuzione della responsabilità della sicurezza alimentare ai produttori;
- ✓ L'attuazione di rapide ed efficaci misure d'intervento di fronte ad emergenze sanitarie che si manifestino in qualsiasi punto della catena alimentare;
- ✓ L'esecuzione di appropriati controlli ufficiali;
- ✓ La necessità di garantire un'adeguata comunicazione ai consumatori che devono essere tenuti adeguatamente informati sull'attività degli organismi istituzionalmente preposti all'assicurazione della salubrità degli alimenti, sulle nuove preoccupazioni in materia di sicurezza alimentare, sui rischi che certi alimenti possono presentare per determinati gruppi di persone.

La sicurezza degli alimenti è una responsabilità condivisa; la qualità e l'igiene dei prodotti alimentari non riguardano, infatti, esclusivamente l'industria alimentare, ma dipendono dallo sforzo congiunto di tutti gli attori della complessa catena di produzione, lavorazione, trasporto e vendita al dettaglio degli alimenti, e nondimeno dagli stessi consumatori. E', infatti, di fondamentale importanza che anche i consumatori facciano la loro parte per avere la garanzia di consumare alimenti sicuri, in modo particolare facendo attenzione all'igiene alimentare, alla preparazione e alla corretta conservazione dei prodotti. Il processo di cambiamento inizia nel gennaio 2000, quando la Commissione Europea emana "il Libro Bianco sulla sicurezza alimentare " nel quale si delinea una nuova strategia che prevede che la salubrità degli alimenti si possa assicurare solo ricorrendo a sistemi integrati di controlli di filiera, dalla

produzione delle materie prime al consumo degli alimenti. E' necessario creare un sistema, applicabile in modo omogeneo in tutta Europa, che poggi su solide basi scientifiche e su un moderno contesto legislativo e che individui gli obiettivi, le azioni necessarie per il loro raggiungimento e chi deve agire nei diversi livelli . Le priorità individuate sono: identificare, caratterizzare e verificare tutti i fattori di abbattimento del rischio sanitario attuabili a partire dalla produzione fino al consumo dell'alimento.

### **1.3.1 Il sistema HACCP**

Già nei primi anni del 1900, alcuni ricercatori, Van Oyen, Meyer ed in seguito Wilson e Mossel, osservarono che la garanzia della sicurezza degli alimenti non poteva essere affidata esclusivamente al controllo analitico dei prodotti finiti ed effettuarono le prime osservazioni che dimostravano che la sicurezza degli alimenti era ottenibile solo mediante misure e interventi da applicare nel corso del processo produttivo, della conservazione e della distribuzione.

Un sistema che tenga conto di queste esigenze si è andato consolidando in Europa negli anni 90', ma è stato adottato dagli Stati Uniti sin dagli inizi degli anni 70'. Esso è conosciuto come HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Points)<sup>11</sup>. Era stato inizialmente ideato alla fine degli anni 60' con l'intento di assicurare che gli alimenti forniti agli astronauti della NASA non avessero alcun effetto negativo sulla salute o che potessero mettere a rischio missioni nello spazio <sup>12</sup>.

Oggi tale sistema consiste in un programma di autocontrollo che ogni operatore del settore alimentare deve mettere in pratica al fine di valutare e stimare pericoli e rischi e stabilire misure di controllo per prevenire l'insorgere di problemi igienico-sanitari. Esso nasce dall'esigenza di garantire la salubrità degli alimenti al fine di prevenire contaminazioni. Prima dell'adozione di questo sistema i controlli venivano effettuati a valle del processo produttivo, con analisi sull'integrità dell'alimento soltanto alla fine della sua produzione, pronto per la vendita al consumatore. Il sistema HACCP mira, invece, a valutare in ogni fase della produzione i rischi che possono influenzare la sicurezza degli alimenti, attuando in questo modo misure di controllo, senza concentrare le ispezioni solamente al prodotto finito. Lo scopo è quello di individuare le fasi del processo che possono rappresentare un punto critico. Qualsiasi alimento, infatti, può risultare contaminato già all'origine, per la presenza di microrganismi, oppure può contaminarsi durante le varie fasi di produzione, confezionamento, trasporto e distribuzione al consumatore. Attraverso la valutazione dei

rischi intrinseci attribuibili a un determinato prodotto o al processo che lo realizza, e mediante l'individuazione delle misure necessarie per controllare tali rischi, il sistema HACCP consente di prevenire, eliminare o ridurre a un livello accettabile i pericoli potenziali della produzione alimentare <sup>13</sup>.

In pratica, le aziende che adottano tale sistema devono compiere due azioni importanti:

- ✓ Individuare all'interno del loro processo produttivo alimentare quali siano i pericoli specifici che possono in qualche modo compromettere la salubrità di un alimento durante la sua vita;
- ✓ Predisporre le misure preventive più opportune e di controllo per garantire la sicurezza igienico-sanitaria dell'alimento preso in considerazione. In base alle norme legislative attuali, ogni attività che in qualche modo abbia a che fare con gli alimenti (compresi i locali pubblici di somministrazione), dovrà dotarsi di un piano HACCP per la sicurezza alimentare e applicarlo in modo corretto <sup>14</sup>.

La novità essenziale consiste nel concetto di prevenzione, un elemento sconosciuto alle vecchie tipologie di controllo igienico-sanitario; le imprese alimentari e le autorità sanitarie svolgevano, infatti, un'azione di verifica attraverso ispezioni e controlli sul prodotto finito o sulle condizioni di lavoro adottate nei locali di produzione o di commercializzazione. Questo metodo d'indagine interviene "a valle", in altre parole dopo che si è manifestata una contaminazione alimentare o un qualsiasi altro problema di natura igienico-sanitaria. Il sistema HACCP, viceversa, consente all'operatore di agire "a monte", prima che gli eventi potenzialmente negativi possano minare la sicurezza igienica durante le fasi di lavorazione portando a contaminare l'alimento. Questo metodo viene definito pro-attivo e si basa sull'idea che "un processo ben studiato garantisce maggiormente rispetto ad un controllo finale" <sup>4</sup>. In altri termini, il sistema HACCP si estrinseca lungo tutta la filiera produttiva, e quanto più a monte è possibile, in maniera da realizzare un controllo continuo del processo, che garantisca l'assoluta salubrità e sicurezza del prodotto finito, attraverso la prevenzione dei pericoli che potrebbero incidere negativamente, sulle caratteristiche dell'alimento <sup>15</sup>.

Esso segue principi relativamente semplici, che implicano una logica sequenza di attività:

- ✓ Individuazione dei pericoli presenti nel ciclo e valutazione del rischio in base alla loro gravità intrinseca e alla probabilità di accadimento. Valutazione di tutte le informazioni derivanti dalle fasi precedenti e definizione di una lista dei potenziali pericoli relativi all'intero processo produttivo, dal ricevimento delle materie prime

- all'uscita dei prodotti finiti dallo stabilimento. Deve essere valutato, inoltre, quale pericolo deve essere controllato dal piano HACCP, in base alla sua gravità e probabilità di rendersi effettivamente presente. Dopo aver definito la lista dei pericoli relativi al prodotto/ciclo di produzione desiderato devono essere descritte per ogni rischio le misure preventive che possono essere applicate per controllarlo;
- ✓ Identificazione dei punti critici di controllo (CCPs), tappe o procedure in corrispondenza delle quali il controllo può essere applicato al fine di ridurre un potenziale pericolo per la sicurezza alimentare;
  - ✓ Determinazione dei limiti critici per ogni CCP. Il limite critico è quel valore che contraddistingue l'accettabilità dall'inaccettabilità. Per rimanere sotto controllo un CCP deve rientrare nel range di questo valore;
  - ✓ Messa a punto di un sistema di monitoraggio che permetta di assicurare il controllo dei CCPs tramite un test, oppure con osservazioni programmate. Il sistema di monitoraggio sarà quindi costituito dalle rilevazioni, in momenti definiti, di un determinato parametro che deve permanere entro un limite critico stabilito;
  - ✓ Definizione dell'azione da attuare quando il monitoraggio indica che un particolare CCP è fuori controllo. Le azioni correttive definite per ogni CCP, meglio dette "trattamenti", richiedono sia le azioni di trattamento delle non conformità, che la revisione del sistema per eliminare la possibilità che la deviazione dei parametri prefissati possa verificarsi nuovamente;
  - ✓ Determinazione di un sistema di gestione della documentazione, affinché tutti i dati raccolti siano registrati e conservati al fine di dimostrare che il sistema HACCP è valido e operativo <sup>16</sup>.

Con il Decreto Legislativo del 26 Maggio 1997, N. 155, che recepisce le direttive europee 93/43/CEE e che è stato sostituito dal Regolamento 853/CE del 2004, è entrato in vigore per tutte le industrie alimentari l'obbligo di applicare il sistema HACCP. La circolare ministeriale n° 11 del 7/8/1998 ha precisato che tale attività di autocontrollo deve includere <sup>17</sup>:

- ✓ Analisi svolte da laboratori specializzati;
- ✓ Documentazione della formazione e addestramento del personale;
- ✓ Verifiche periodiche del sistema HACCP implementato.

Al fine della corretta applicazione del sistema d'autocontrollo, l'industria alimentare si avvale di laboratori d'analisi che hanno lo scopo di identificare gli eventuali pericoli nei prodotti. Per



questo è stato introdotto in Europa il sistema HACCP con la direttiva 93/43 e in Italia con il Regolamento 852 (che ha sostituito il D.L. 155/97), che prevede l'obbligo di applicazione del sistema HACCP a qualsiasi livello della catena alimentare.

### **1.3.2 Il pacchetto igiene**

La salubrità degli alimenti è disciplinata da una complessa normativa Nazionale e Comunitaria, la cui osservanza da parte dei produttori è sotto il controllo del Servizio Sanitario Nazionale. La necessità di assicurare i requisiti di salubrità, genuinità e qualità nutritiva dei prodotti alimentari ha richiesto inoltre l'emanazione di una serie di leggi e decreti speciali a completamento della normativa generale.

Al regolamento 178/02 in vigore dal gennaio 2005, testo 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, segue l'entrata in vigore del "Pacchetto Igiene" dal 1° gennaio 2006. Questo pacchetto comprende un gruppo di regolamenti e di direttive che riordinano la normativa comunitaria in materia d'igiene e di controlli sugli alimenti, precisando le tematiche della sicurezza alimentare e le modalità di applicazione del sistema HACCP e superando le normative comunitarie in materia di autocontrollo, basate sulla Direttiva 94/43/CEE <sup>18</sup>.

Il "Pacchetto Igiene" è composto da:

- ✓ Reg. (CE) n° 852/2004, "sull'igiene dei prodotti alimentari";
- ✓ Reg. (CE) n° 853/2004, "che stabilisce norme specifiche in materia d'igiene per gli alimenti di origine animale";
- ✓ Reg. (CE) n° 854/2004, "che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano";
- ✓ Reg. (CE) n° 882/2004, "relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali".

Nella stessa data, 1 gennaio 2006, sono entrati altresì in vigore:

- ✓ Reg. (CE) n° 183/2005, “che stabilisce requisiti per l’igiene dei mangimi”;
- ✓ Reg. (CE) n° 2074/2005, “recante modalità di attuazione relative a taluni prodotti di cui al regolamento (CE) n° 853/2004 e all’organizzazione di controlli ufficiali a norma dei regolamenti (CE) n° 854/2004 e 852/2004, deroga al regolamento (CE) n° 852/2004 e modifica dei regolamenti (CE) n° 853/2004 e 854/2004”;
- ✓ Reg. (CE) n° 2075/2005, “che definisce norme specifiche applicabili ai controlli ufficiali relativi alla presenza di trichine nelle carni”;
- ✓ Reg. (CE) n° 2076/2005, “che fissa disposizioni transitorie per l’attuazione dei regolamenti (CE) n° 853/2004, 854/2004 e 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e che modifica i regolamenti (CE) n° 853/2004 e 854/2004”;
- ✓ Reg. (CE) n° 2073/2005, “sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari”.

### **1.3.3 Il regolamento 2073/2005 CE e s.m.i. (sue modifiche e integrazioni) (1441/2007/CE)**

Il regolamento 2073/2005/CE entrato in vigore il 1° Gennaio 2006 in tutti gli Stati membri dell’Unione Europea con l’obiettivo di elevare il livello di protezione dei consumatori, giunge finalmente ad aggiornare e armonizzare i criteri microbiologici dei prodotti alimentari contenuti nelle precedenti direttive comunitarie. Si rivolge a tutti gli operatori del settore alimentare (OSA) che operano nelle diverse fasi della filiera quali lavorazione, fabbricazione, manipolazione compresa la fase della vendita al dettaglio e della distribuzione. La sua lettura deve essere fatta tenendo in mente i concetti e l’approccio preventivo “*from farm to fork*” per la sicurezza degli alimenti relativi ai regolamenti del pacchetto igiene. Il regolamento 2073/2005/CE non prende in considerazione solo i microrganismi, ma assegna un ruolo determinante sia alle procedure di gestione della sicurezza, quali HACCP, GHP (Good Hygiene Practing) e GMP (Good Manufacturing Practices) applicate ai diversi livelli della filiera, sia agli alimenti in sé introducendo per quest’ultimi alcuni fattori legati al tipo di substrato alimentare che condizionano lo sviluppo microbico. Tale regolamento, inoltre, stabilisce che ogni operatore del settore alimentare deve garantire il rispetto dei criteri

microbiologici relativi ai prodotti alimentari. In **Tabella 3** sono riportate le due recenti definizioni di criterio microbiologico.

Tabella 3  
Criteri microbiologici

<b>CODEX 1997</b>	Il criterio microbiologico definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari in base all'assenza, alla presenza o al numero di microrganismi compresi i parassiti, e/o in base alla quantità delle relative tossine/metaboliti, per unità di massa, volume, superficie o lotto.
<b>REGOLAMENTO 2073/2005</b>	Il criterio microbiologico definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all'assenza, alla presenza o al numero di microrganismi, e/o in base alla quantità delle relative tossine/metaboliti, per unità di massa, volume, superficie o partita.

Si noti come (e ciò costituisce la novità introdotta dal regolamento 2073/2005/CE) nella nuova definizione di criterio microbiologico, a seguito dei pareri espressi sia dal *Scientific Committee of Food* che dal SCVPH (Scientific Committee of Veterinary Public Health), il campo si estenda fino ad includere anche l'accessibilità del processo. Il regolamento 2073/2005/CE introduce, inoltre, due tipi di criteri: il criterio di sicurezza alimentare (CSA) e il criterio di igiene del processo (CIP) (**Tabella 4**).

Tabella 4  
Criteri microbiologici Regolamento 2073/2005/CE

<b>CRITERI DI SICUREZZA ALIMENTARE</b>	<b>CRITERI DI IGIENE DI PROCESSO</b>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<b>Microorganismi aerobi</b>
<b><i>Salmonella</i></b>	Enterobacteriaceae
Enterotossina stafilococcica	<i>Salmonella</i>
<i>Enterobacter sakazakii</i>	<b><i>E. coli</i></b>
<i>E.coli</i>	Stafilococchi coagulasi positivi
Istamina	/

I criteri di sicurezza del prodotto alimentare non vengono più applicati al prodotto al momento della sua uscita dallo stabilimento di fabbricazione, ma devono essere applicati al prodotto stesso per tutta la durata della sua vita commerciale. I criteri di igiene di processo sono, invece, finalizzati alla verifica dell'accettabilità dal punto di vista igienico-sanitario della lavorazione effettuata; devono quindi essere applicati ai semilavorati o al prodotto durante la lavorazione o al termine di questa, a seconda dei casi, focalizzando i controlli sui parametri microbiologici indicatori dei punti dove il rischio di contaminazione è più elevato.

Vi è, quindi, la necessità non prescindibile di analizzare in modo critico l'intera filiera produttiva, sia da parte del comparto alimentare, che dell'autorità competente. E' preciso compito dell'Operatore del Settore Alimentare (OSA) capire e individuare le fasi di processo che potenzialmente sono in grado di elevare il pericolo oltre i limiti concessi. Nel capitolo 1.1.6 il Regolamento 2073/2005/CE e s.m.i. stabilisce la ricerca di *Salmonella spp.* come criterio di sicurezza alimentare in "carne macinata e preparazioni a base di carne di animali diversi dal pollame, destinate ad essere consumate cotte" <sup>19</sup>. Il campione prelevato deve essere costituito da 5 unità campionarie (n); il limite applicato è l'assenza in 10 g per ognuna delle 5 unità analizzate e (c) il metodo di analisi di riferimento è l'EN/ISO 6579 (

**Tabella 5).**

**Tabella 5**  
**Criteri di sicurezza alimentare**

Categoria alimentare	Microorganismi/loro tossine, metaboliti	Piano di campionamento (1)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio
		n	c	m	M		
1.1. Alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali (4)	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Assente in 25 g		EN/ISO 11290-1	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.2. Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g (5)		EN/ISO 11290-2 (6)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
		5	0	Assente in 25 g (7)		EN/ISO 11290-1.	Prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce
1.3. Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali (4) (8)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2 (9)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.4. Carne macinata e preparati a base di carne destinati ad essere consumati crudi	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.5. Carne macinata e preparazioni a base di carne di pollame destinate ad essere consumate cotte	<i>Salmonella</i>	5	0	Dall'1.1.2006 Assente in 10 g Dall'1.1.2010 Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.6. Carne macinata e preparazioni a base di carne di animali diversi dal pollame destinate ad essere consumate cotte	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 10 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

Nel capitolo 2.1.6 il Regolamento riporta i criteri di igiene di processo per campioni di carne macinata <sup>20</sup>; le analisi da svolgere sono la ricerca di *E. coli* e il conteggio delle colonie aerobiche. Il piano di campionamento e i limiti vengono riportati nella **Tabella 6**:

Tabella 6  
Criteri di igiene del processo

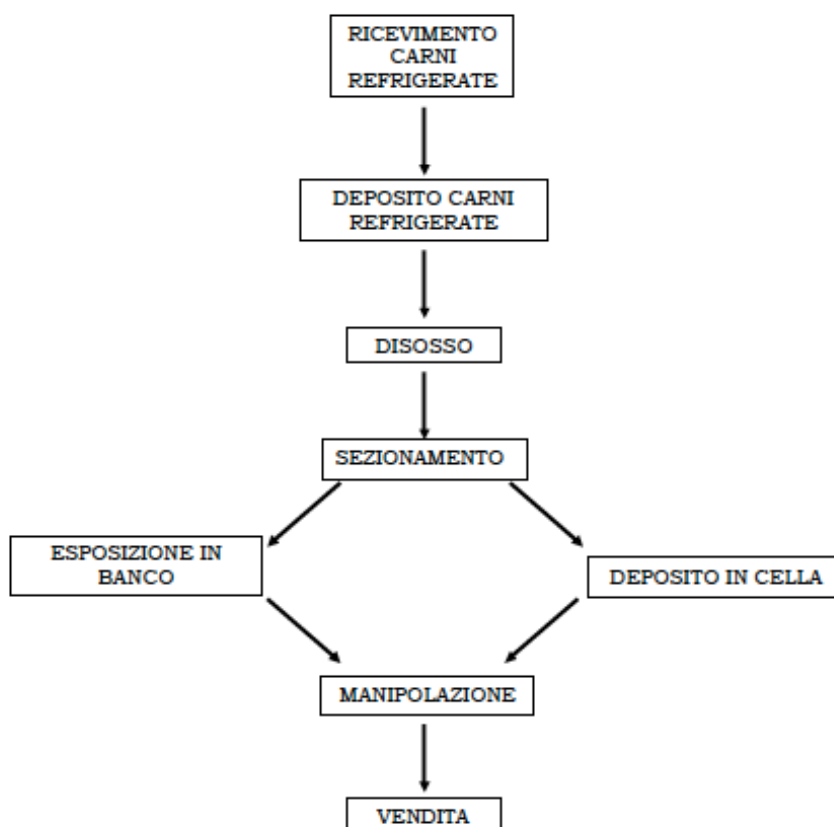
Categoria alimentare	Microrganismi	Piano di campionamento (1)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio	Azione in caso di risultati insoddisfacenti
		n	c	m	M			
2.1.6. Carne macinata	Conteggio delle colonie aerobiche (4)	5	2	$5 \times 10^5$ ufc/g	$5 \times 10^6$ ufc/g	ISO 4833	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e miglioramento della scelta e/o dell'origine delle materie prime
	<i>E. coli</i> (5)	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 o 2	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e miglioramento della scelta e/o dell'origine delle materie prime

Le analisi microbiologiche svolte fanno riferimento alle modalità e ai limiti presenti nelle tabelle sopra riportate per i parametri di interesse, tranne per il numero di unità campionarie. Nel corso di questo studio sono state controllate principalmente macellerie di piccole dimensioni e in accordo con il servizio veterinario della zona, che si occupa di visionare la corretta applicazione del sistema HACCP da parte degli OSA, si è scelto di eseguire le analisi su un'unica unità campionaria.



## 2. SCOPO DELLA TESI

Le carni macinate costituiscono una produzione fortemente richiesta da parte del consumatore, sia a livello della grande che della piccola distribuzione. Si tratta però di un alimento dotato di numerosi fattori intrinseci di rischio, ascrivibili sia alle particolari caratteristiche fisiche della derrata, che rappresentano una condizione per lo sviluppo di svariati microrganismi, sia al tipo di lavorazione, che consente un'enorme dispersione degli eventuali contaminanti del prodotto. Importanti sono inoltre i pericoli di contaminazioni crociate derivanti dall'utilizzo di attrezzature non in perfette condizioni igienico-sanitarie. Il diagramma di flusso riportato sotto, può dare un'idea delle fasi di lavorazione durante le quali si possono avere dei fenomeni di contaminazione, dovuti soprattutto a inesatte procedure di lavorazione.



Il rischio di contaminazione riguarda sia i batteri potenzialmente patogeni, sia quelle specie microbiche che possono rappresentare un utile indice per determinare l'igiene di lavorazione, sia infine i batteri alteranti.

Con la sempre maggiore responsabilizzazione dei produttori, conseguenza diretta dell'emanazione dei provvedimenti legislativi orientati ad estendere la disciplina dell'autocontrollo, diviene evidente la necessità di inquadrare, da un punto di vista microbiologico, tanto le materie prime quanto l'alimento pronto per il consumo.

Secondo quanto riportato nell'articolo 4 del Regolamento 852/2004 ogni OSA è tenuto a rispettare i criteri microbiologici <sup>21</sup> riportati nel Reg. 2073/2005. Tali regolamenti non specificano le modalità e le frequenze di campionamenti ed analisi da eseguire su campioni alimentari e superfici di lavorazione, lasciando ampia decisione all'operatore <sup>22</sup>. L'OSA, supportato, se necessario, da un laboratorio esterno, esegue una valutazione della propria attività, stabilendo in questo modo un calendario di controlli da effettuare. Vengono valutati: la presenza di un piano di autocontrollo adeguato, la sua attuazione all'interno dell'attività e gli eventuali punti critici di controllo. In questo modo è possibile stabilire su quali alimenti eseguire analisi periodiche, tra quelli che possono comportare un maggior rischio igienico sanitario. In generale, nelle macellerie i prodotti maggiormente controllati sono i pronti a cuocere, i macinati e gli insaccati freschi.

L'obiettivo principale di questa tesi, svolta nel laboratorio di microbiologia privato Dedalo s.r.l., è stato quello di valutare dal punto di vista microbiologico il livello di contaminazione presente nelle carni macinate bovine, vendute in provincia di Vicenza, verificando se il prodotto in vendita al pubblico presentasse i requisiti necessari di idoneità igienico-sanitaria e di indagare, qualora tali requisiti non fossero rispettati, le possibili cause applicando azioni preventive e correttive.

Al fine di determinare il profilo microbiologico del prodotto, abbiamo ritenuto necessario considerare la presenza di *Salmonella spp.*, come criterio di sicurezza alimentare e la presenza di *E. coli* e della carica batterica mesofila, come criteri di igiene di processo, attraverso analisi di microbiologia classica.



### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Campionamento e preparazione dei campioni**

Il campionamento costituisce la prima operazione di ogni procedimento analitico. Si tratta di un'operazione complessa e delicata che può condizionare i risultati di tutte le fasi successive. Pertanto il campione deve essere rappresentativo del materiale in esame. Il personale incaricato a eseguire il campionamento verifica le tipologie di prodotti/matrici da campionare, le modalità e quantità di prelievo a seconda del tipo di analisi richiesta e quindi del metodo di prova applicato al fine di predisporre e preparare il materiale e le attrezzature necessarie per lo stesso e per le eventuali misure aggiuntive da effettuare in campo. Il personale incaricato deve essere a conoscenza, inoltre, della regione sociale del committente, del nominativo del cliente e del luogo e dell'orario del prelievo. Durante lo svolgimento delle proprie funzioni, i tecnici abilitati al campionamento devono utilizzare indumenti e accessori che garantiscano la sterilità della procedura. Il campione viene prelevato, confezionato, trasportato e manipolato prima della prova in modo da essere preservato da modificazioni dei suoi componenti e delle caratteristiche da valutare. Ogni campione deve riportare un'etichetta identificativa che lo renda univocamente identificabile. I campioni vengono trasportati all'interno di appositi contenitori refrigerati.

##### **3.1.1 Come eseguire il prelievo**

Nelle normative precedentemente descritte non viene specificata la modalità di campionamento e spetta ad ogni singolo laboratorio istituire una propria Istruzione Operativa. Durante il prelievo il campione non deve subire danni, modifiche o contaminazioni. Per la sicurezza degli operatori adibiti al campionamento e per prevenire eventuali contaminazioni dei campioni, è d'obbligo, durante il campionamento, l'utilizzo di guanti in lattice o PVC. Le operazioni da eseguire sono le seguenti:

- ✓ Indossare gli indumenti e gli accessori necessari per evitare la contaminazione del campione;
- ✓ Prelevare il campione, utilizzando strumentazione sterile, e riporlo in un contenitore sterile e richiudibile;

- ✓ Valutare di volta in volta la necessità di prelevare più unità campionarie;
- ✓ Richiudere saldamente il contenitore ed identificarlo in modo indelebile;
- ✓ Controllare almeno visivamente che la quantità campionata sia uguale a quella richiesta per il tipo di analisi da effettuare;
- ✓ Compilare il verbale di prelievo.

### 3.1.2 Metodo tradizionale colturale

I metodi tradizionali di analisi microbiologiche per la rilevazione di microrganismi presenti in un liquido, in un solido o negli alimenti si basa sulla rilevazione della moltiplicazione microbica, all'interno di un terreno agarizzato incubato a temperatura ottimale, attraverso il metodo della conta su piastra. Un'aliquota dell'alimento, o una sua diluizione, viene seminata per inoculo o per spatolamento su una capsula Petri contenente il mezzo di coltura specifico per il microrganismo ricercato.

Dopo un periodo d'incubazione a temperatura ottimale, la presenza/assenza del microrganismo ricercato o la sua quantificazione nell'aliquota di campione, opportunamente seminata, viene messa in evidenza dalla crescita nel terreno di colonie caratteristiche.

Eventuali prove successive, partendo dalla coltura iniziale, costituiscono prove di conferma alle quali possono fare seguito ulteriori saggi per la definitiva identificazione dei microrganismi ricercati. Utilizzando terreni differenti e opportune temperature di incubazione, è possibile rendere selettivo il metodo al fine di coltivare solo i gruppi microbici di interesse e, talora, una singola specie batterica.

Tali metodi hanno l'obiettivo di isolare esclusivamente i microrganismi presenti nei campioni da sottoporre ad analisi, evitando contaminazioni dovute all'ambiente o agli stessi operatori.

Si rende così indispensabile l'adozione di alcune precauzioni: la pulizia e disinfezione accurata delle attrezzature e degli ambienti di lavoro e la garanzia della sterilità durante tutte le fasi di analisi. Per questo motivo tutte le soluzioni e i terreni di coltura vengono autoclavati immediatamente dopo la preparazione, in piccole aliquote monouso.

**Punti di forza:** La moltiplicazione dei microrganismi si può facilmente osservare a occhio nudo sia in terreni selettivi solidi che liquidi.

**Limiti:** Tali metodi richiedono un grande lavoro e la necessità di un laboratorio attrezzato per poter sterilizzare preventivamente il materiale e per poter mantenere le condizioni di sterilità.

L'assenza di quest'ultima potrebbe favorire contaminazioni a livello del campione con conseguente perdita di significato dell'analisi effettuata.

### **3.2 Metodica UNI EN ISO 16649-2:2001 per la conta di *Escherichia coli* $\beta$ -glucuronidasi-positivo**

✓ Porzione di prova, sospensione iniziale e diluizioni:

Per gli alimenti solidi pesare asetticamente 10 g del campione in un sacchetto per omogeneizzazione e diluire in rapporto 1:10 con acqua peptonata (APPENDICE A) preparata secondo le indicazioni della casa produttrice (OXOID) e preriscaldata a  $30\pm 1^\circ\text{C}$ . Omogeneizzare, tramite stomacher, per non più di tre minuti per miscelare il campione. Agitare ripetutamente il campione di prova e aprire il contenitore all'interno della cappa a flusso laminare. Una volta omogeneizzato il campione è necessario eseguire l'analisi entro e non oltre 30-45 minuti. Se ritenuto necessario, allestire diluizioni scalari in base 10 del campione da testare utilizzando acqua peptonata preriscaldata a  $30\pm 1^\circ\text{C}$ .

✓ Inoculazione e incubazione:

Utilizzando una pipetta sterile, trasferire su ogni piastra 1 ml di campione. Inoculare due piastre per diluizione e ripetere la procedura descritta per le ulteriori diluizioni, se necessario, utilizzando una nuova pipetta per ogni diluizione. Versare in ogni piastra circa 15 ml di terreno TBX (APPENDICE A), preparato e raffreddato a  $44-47^\circ\text{C}$  nel bagnetto termostato. Mescolare attentamente l'inoculo con il terreno e lasciare solidificare. Infine, riporre le piastre nell'incubatore a  $44\pm 1^\circ\text{C}$  per 18-24 ore. Il tempo totale dell'incubazione non deve superare le 24 ore.

✓ Conta delle unità formanti colonie:

Contare le colonie tipiche di *E.coli* in ogni piastra che contenga meno di 150 Unità Formanti Colonia (UFC) tipiche e meno di 300 UFC totale tra tipiche e atipiche.

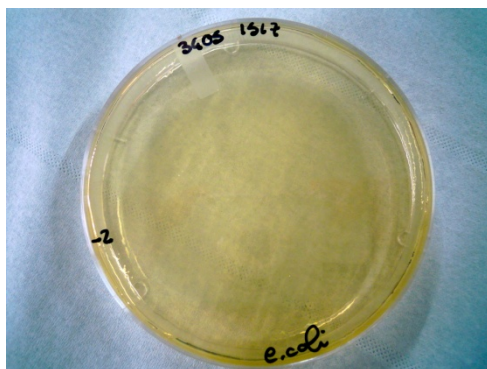


Figura 1  
Terreno di coltura selettivo (TBX) per E. coli prima dell'incubazione

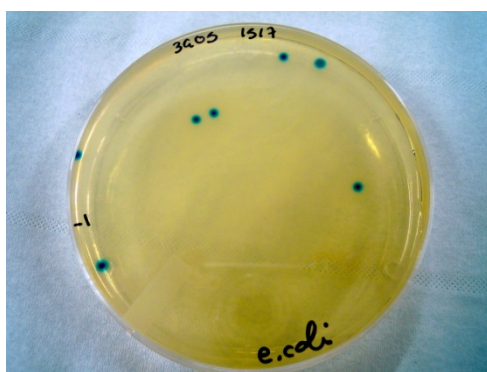


Figura 2  
Terreno di coltura selettivo (TBX) per E. coli dopo incubazione, con crescita di colonie tipiche.

### 3.3 Metodica UNI EN ISO 4833:2004 per la conta di microorganismi

✓ Porzione di prova, sospensione iniziale e diluizioni:

Per gli alimenti solidi pesare asetticamente 10 g del campione in un sacchetto per omogeneizzazione e diluire in rapporto 1:10 con acqua peptonata (APPENDICE A) preparata secondo le indicazioni della casa produttrice (OXOID) e preriscaldata a  $30\pm 1^\circ\text{C}$ . Omogeneizzare, tramite stomacher, per non più di tre minuti per miscelare il campione. Agitare ripetutamente il campione di prova e aprire il contenitore all'interno della cappa a flusso laminare. Una volta omogeneizzato il campione è necessario eseguire l'analisi entro e non oltre 30-45 minuti. Se ritenuto necessario, allestire diluizioni scalari in base 10 del campione da analizzare utilizzando acqua peptonata preriscaldata a  $30\pm 1^\circ\text{C}$ .

✓ Inoculazione e incubazione:

Utilizzando una pipetta sterile, trasferire su ogni piastra 1 ml di campione. Inoculare due piastre per diluizione e ripetere la procedura descritta per le ulteriori diluizioni, se necessario, utilizzando una nuova pipetta per ogni diluizione. Versare in ogni piastra circa 15 ml di terreno PCA (APPENDICE A), preparato e raffreddato a 44-47°C nel bagnetto termostato. Mescolare attentamente l'inoculo con il terreno e lasciare solidificare. Infine, riporre le piastre nell'incubatore a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  per 72 ore.

✓ Conta delle unità formanti colonie:

Contare le colonie in ogni piastra che contenga meno di 300 UFC.

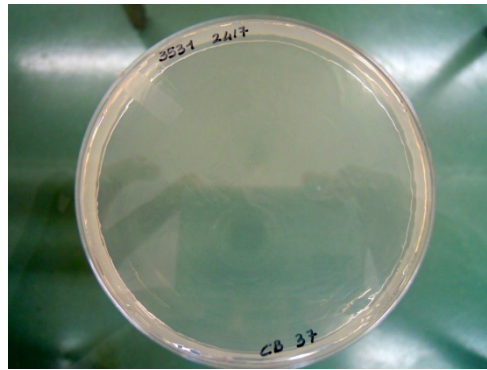


Figura 3

Terreno di coltura generico (PCA) per carica batterica mesofila, prima dell'incubazione.

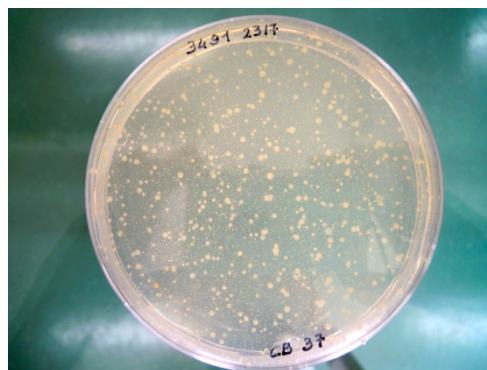


Figura 4

Terreno di coltura generico (PCA) per carica batterica mesofila dopo incubazione, con crescita di colonie.

### 3.4 Metodica UNI EN ISO 6579:2008 per la ricerca di *Salmonella spp.*

✓ Porzione di prova, sospensione iniziale e diluizioni:

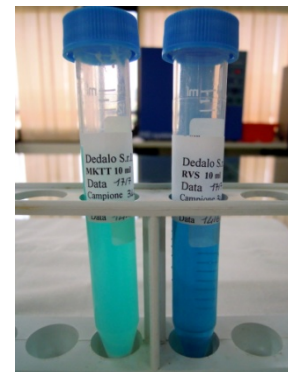
Per gli alimenti solidi pesare asepticamente 10 g del campione in un sacchetto per omogeneizzazione e diluire in rapporto 1:10 con acqua peptonata (APPENDICE A) preparata secondo le indicazioni della casa produttrice (OXOID) e preriscaldata a  $30\pm 1^\circ\text{C}$ . Omogeneizzare, tramite stomacher, per non più di tre minuti per miscelare il campione. Agitare ripetutamente il campione di prova e aprire il contenitore all'interno della cappa a flusso laminare. Una volta omogeneizzato il campione è necessario eseguire l'analisi entro e non oltre 30-45 minuti. Se ritenuto necessario, allestire diluizioni scalari in base 10 del campione da testare utilizzando acqua peptonata preriscaldata a  $30\pm 1^\circ\text{C}$ .

✓ Pre-arricchimento non selettivo:

Incubare la sospensione ottenuta a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  per 18-24 ore.

✓ Arricchimento selettivo:

Trasferire 0,1 ml della coltura ottenuta in una provetta contenente 10 ml del brodo RVS (APPENDICE A); trasferire 1 ml della coltura ottenuta in una provetta contenente 10 ml del brodo MKTTn (APPENDICE A). Infine incubare i due brodi inoculati a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  per  $24\pm 3$  ore.



✓ Isolamento e identificazione:

Utilizzando la coltura ottenuta nel brodo RVS, dopo un'incubazione di  $24\pm 3$  ore, inoculare, con un'ansa per batteriologia, la superficie di una piastra Petri con diametro 90 mm contenente il terreno selettivo d'isolamento agar XLD (APPENDICE A), in modo da ottenere delle colonie ben isolate. Procedere allo stesso modo con il secondo terreno selettivo d'isolamento SS (APPENDICE A). Utilizzando la coltura ottenuta nel brodo MKTTn ripetere lo stesso procedimento descritto sopra. Collocare le piastre in incubatore a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  per  $24\pm 3$  ore. Dopo l'incubazione esaminare le piastre ricercando la presenza di colonie tipiche e

atipiche di Salmonella; le colonie sospette si presentano con un centro nero e una zona leggermente trasparente di colore rossiccio.

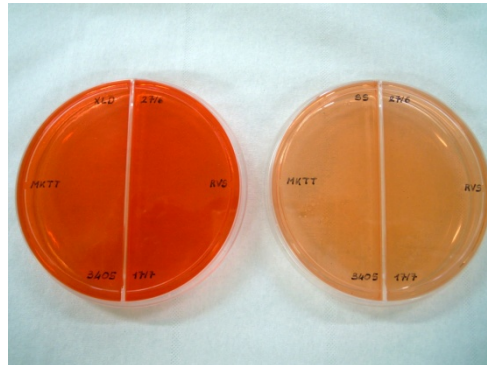


Figura 5  
Terreno di coltura selettivo (SS e XLD) per Salmonella spp. prima dell'incubazione.

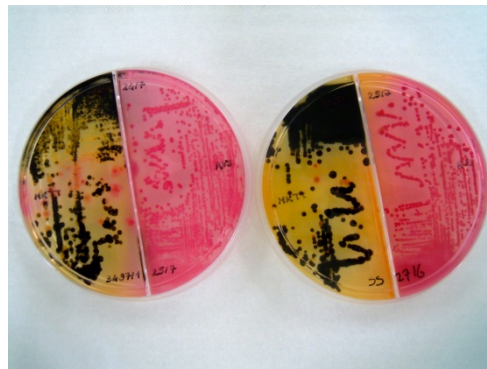


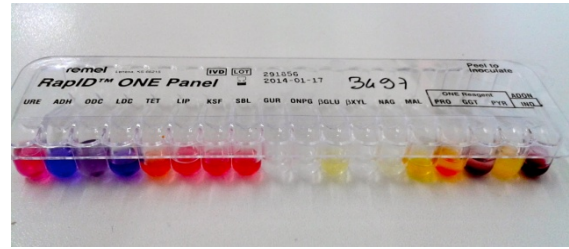
Figura 6  
Terreno di coltura selettivo (SS e XLD) per Salmonella spp. dopo incubazione, con crescita di colonie tipiche (nere) e atipiche.

✓ Selezione delle colonie per la conferma:

Prelevare da ciascuna piastra di ciascun terreno selettivo almeno una colonia considerata tipica o sospetta e altre quattro se la prima è negativa. Eseguire lo striscio delle colonie selezionate sulla superficie di una piastra Petri di agar nutritivo NUTRIENT (APPENDICE A) preessicata, in modo da consentire lo sviluppo di colonie ben isolate. Incubare le piastre inoculate a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  per  $24\pm 3$  ore.

✓ Conferma biochimica:

Prelevare dalla piastra Petri precedentemente incubata alcune colonie e stemperarle in una provetta preconstituita e fornita dal fornitore. Inoculare il contenuto in un kit di



identificazione biochimica (APPENDICE A), mediante pipetta sterile (circa 0,1 ml per pozzetto) e incubare a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  per 4 ore. La lettura del kit si basa sulle reazioni colorimetriche avvenute e l'identificazione del microrganismo avviene mediante software.

✓ Conferma sierologica e sierotipizzazione:

La rilevazione della presenza di antigeni di Salmonella O-, Vi e H viene analizzata tramite agglutinazione con siero appropriato, da colonie pure e dopo auto-agglutinazione i ceppi possono essere eliminati.

✓ Eliminazione dei ceppi auto-agglutinanti:

Mettere una goccia di soluzione salina su un vetrino perfettamente pulito. Stemperare nella goccia, per mezzo di un'ansa, parte della colonia da analizzare, in modo da ottenere una sospensione torbida e omogenea. Fare oscillare gentilmente il vetrino da 30 a 60 secondi. Osservare i risultati contro uno sfondo scuro, preferibilmente con l'aiuto di una lente d'ingrandimento. Se i batteri sono a blocchi in unità più o meno distinte, i ceppi sono considerati auto-agglutinanti, e non devono essere sottoposti alle prove successive, in quanto non è possibile individuare gli antigeni.

✓ Esame per l'antigene O:

Usare una colonia pura non-autoagglutinante, procedere come sopra descritto, usando, invece che una goccia di soluzione salina, una goccia di antisiero O. Se si verifica agglutinazione, la reazione deve essere considerata positiva. Usare sieri poli- e monovalenti uno dopo l'altro.



✓ Esame per l'antigene Vi:

Usare una colonia pura non-autoagglutinante, procedere come sopra descritto, usando, invece che una goccia di soluzione salina, una goccia di antisiero Vi. Se si verifica agglutinazione, la reazione deve essere considerata positiva.

✓ Esame per l'antigene H:

Usare una colonia pura non-autoagglutinante, procedere come sopra descritto, usando, invece che una goccia di soluzione salina, una goccia di antisiero H. Se si verifica agglutinazione, la reazione deve essere considerata positiva.



#### 4. RISULTATI

Nel presente lavoro sono stati analizzati, nell'arco di sei mesi, 130 campioni di carni macinate fresche provenienti da diverse macellerie ubicate in provincia di Vicenza, allo scopo di valutare la contaminazione microbiologica sia per quanto riguarda i criteri di sicurezza alimentare (ricerca di *Salmonella spp.*) che per i criteri di igiene di processo (conta della carica batterica mesofila e di *E. coli*). Gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando la metodica culturale tradizionale di microbiologia classica.

Dopo aver incubato i terreni specifici alle temperature idonee, permettendo così la crescita delle colonie, per il metodo qualitativo, utilizzato per la ricerca di *Salmonella spp.*, è stata riportata la presenza/assenza del patogeno, mentre, per quanto riguarda i due metodi quantitativi (*E. coli* e carica batterica mesofila), è stata effettuata la conta delle colonie per singola piastra.

In microbiologia quantitativa si determina il numero di microrganismi o, più precisamente, il numero di UFC per ml o per g di campione, inoculando in un terreno specifico un determinato volume del campione, se liquido, o sospensione dello stesso se si tratta di campione solido. La concentrazione di microrganismi presenti può essere talmente elevata per cui il conteggio delle colonie su una piastra, inocolata con 1 ml di campione o sospensione, potrebbe risultare impossibile. Realizzando delle diluizioni decimali seriali del campione si opera una diluizione del numero di microrganismi inizialmente presenti in esso. Al momento dell'analisi viene deciso, in base alla tipologia di campione, se fare diluizioni della sospensione iniziale, se si tratta di campione solido o del campione tal quale se si tratta di campione liquido, e quante diluizioni ulteriori eseguire<sup>23</sup>.

Il numero di diluizioni da realizzare può scaturire da una serie di considerazioni:

- ✓ Può essere dettato dai criteri microbiologici da soddisfare per accertare se un campione risulta accettabile;
- ✓ Può essere dettato da precedenti esperienze di analisi condotte su prodotti simili considerando la natura del campione, il tipo di processo tecnologico cui è stato sottoposto, le condizioni in cui viene conservato, etc..;
- ✓ Quando non si hanno notizie sufficienti sul campione per poter prevedere il numero potenziale di microrganismi in esso contenuto, allora è necessario diluire il

campione almeno fino a  $10^{-8}$  -  $10^{-9}$ , considerando che 1 ml o 1 g di alimento contiene in genere non più di  $10^9$  -  $10^{10}$  microrganismi.

Nel presente studio, nel caso di *Salmonella spp.* è stata utilizzata la sospensione iniziale, mentre le diluizioni utilizzate per la conta di *E. coli* e della carica batterica mesofila sono  $10^{-1}$  -  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , e  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , rispettivamente.

#### 4.1 Controllo della qualità del dato nei metodi quantitativi

Prima di procedere all'utilizzo dei risultati ottenuti nelle prove eseguite, è stato verificato che gli stessi siano realmente congruenti con il modello di distribuzione statistico prescelto.

La variazione casuale dovuta alla distribuzione non uniforme delle particelle tra campioni paralleli, persino nelle sospensioni perfettamente miscelate, è una caratteristica dei metodi microbiologici. La variazione casuale di base è inevitabile e non ha niente a che fare con le competenze tecniche o l'apparecchiatura.

Trattandosi di conteggio in doppio su capsule Petri, la letteratura scientifica consiglia l'applicazione del modello di "Distribuzione di Poisson". Per effettuare questo tipo di verifica si ricorre alla distribuzione della variabile  $\chi^2_{p, \nu}$  <sup>24</sup>. Nella statistica applicata alle prove microbiologiche il livello  $p$  di accettabilità è stabilito al 95%, per cui  $p$  è pari a 0,95. I gradi di libertà  $\nu$  sono dati dal numero di piastre inoculate per uno stesso volume meno 1.

E' quindi necessario calcolare la *dispersione* e la *linearità* dei risultati prima di poter stabilire il numero di colonie (UFC) presenti per ml o g di campione.

- ✓ Valutazione della *dispersione* dei risultati ottenuti nelle repliche della stessa diluizione.

Viene calcolato il valore di  $K_{sp}$  con la seguente formula:

$$K_{sp} = \frac{|C_1 - C_2|}{\sqrt{C_1 + C_2}} \leq K_p$$

dove  $C_1$  e  $C_2$  sono rispettivamente i valori ottenuti dalla conta delle due piastre contenenti lo stesso volume di semina.

Si riportano di seguito (Tabella 7) i criteri di accettabilità della dispersione dei dati in funzione del valore di  $K_{sp}$  <sup>25</sup>:

Tabella 7  
Criteri di accettabilità della dispersione

<b><math>Ksp \leq 1,96 \sim 2,0</math></b>	La dispersione dei conteggi è accettabile.
<b><math>2,0 \geq Ksp \leq 2,576 \sim 2,6</math></b>	La dispersione dei conteggi è considerata critica, è necessario approfondire prima di esprimere il risultato. Verificare eventualmente il conteggio della diluizione successiva.
<b><math>Ksp &gt; 2,6</math></b>	La dispersione dei risultati non è accettabile.

- ✓ Valutazione della *linearità* dei risultati ottenuti in diluizioni scalari:

La valutazione della linearità si ottiene con il calcolo di  $G^2$ , utilizzando la seguente formula:

$$G_{m-1}^2 = 2 * \left[ \sum_{i=1}^m \left( C_i \ln \frac{C_i}{R_i} \right) - \left( \sum_{i=1}^m C_i \right) \ln \left( \frac{\sum_{i=1}^m C_i}{\sum_{i=1}^m R_i} \right) \right] < \chi_{p,v}^2$$

dove:

$C_i$  = UFC della esima piastra;

$R_i$  = volume relativo inoculato nella esima piastra;

$m$  = numero di diluizioni esaminate.

Statisticamente il test esprime il rapporto di verosimiglianza della proporzionalità (linearità) delle conte; in parole semplici, il test  $G^2$  è un test di ipotesi in cui si verifica se la differenza delle conte sia di natura casuale, quindi in accordo con la distribuzione di Poisson oppure no. Se il test da esito negativo, significa che vi sono errori tali da modificare la dispersione casuale delle conte.

L'accettabilità dei risultati è data dal confronto tra il valore di tale espressione e quello della variabile  $\chi^2$ , tabulato in corrispondenza del livello di probabilità prefissato e dei gradi di libertà definiti in base al numero di dati sperimentali.

La Tabella 8 ne riporta i valori per diversi livelli di probabilità  $p$  e per numerosi gradi di libertà  $v$ .

Tabella 8  
Distribuzione della probabilità p per la variabile  $\chi^2_{p, v}$ .

$\nu$	$\chi^2_{p=0,95}$	$\chi^2_{p=0,99}$
1	3,841	6,635
2	5,991	9,210
3	7,815	11,345
4	9,488	13,277
5	11,070	15,086
6	12,592	16,812
7	14,067	18,475
8	15,507	20,090

Il valore della variabile  $\chi^2_{p, \nu}$  si trova tabulata nella Tabella 8 per  $p=0,95$  e  $\nu=m-1=2$  ed è pari a 5,991. Anche in questo caso i valori ottenuti sono tutti inferiori a 5,991; questo dimostra la compatibilità e l'accettabilità dei dati raccolti.

#### 4.2 Calcolo dei risultati

Per calcolare il numero  $N$  di unità formanti colonie (UFC) presenti in un grammo di prodotto, abbiamo utilizzato la seguente formula:

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1 n_2 + 0,01 n_3) d}$$

dove:

$\sum c$  somma delle colonie nelle piastre considerate;

$V$  volume dell'inoculo seminato;

$n_1$  numero di piastre considerate, per la prima diluizione;

$n_2$  numero di piastre considerate, per la seconda diluizione;

$n_3$  numero di piastre considerate, per la terza diluizione;

$d$  fattore di diluizione che corrisponde alla prima diluizione (10 g in 110 ml di acqua peptonata).

I risultati ottenuti vengono riportati di seguito, suddivisi per microrganismo ricercato. Nell' APPENDICE B vengono riportati i risultati ottenuti per singolo campione.

***Escherichia coli:***

La tabella sottostante riporta i risultati ottenuti dalla ricerca di *E. coli* in carni macinate fresche:

Tabella 9  
*Escherichia coli*

Campioni conformi	Campioni conformi ma a rischio	Campioni non conformi
127	3	0

Campioni conformi = < m, dove m è uguale a 50 UFC/g.

Campioni conformi ma a rischio = compresi tra 50 e 500 UFC/g.

Campioni non conformi = >M, dove M è uguale a 500 UFC/g..

Per quanto riguarda *E. coli*, sono stati individuati 3 campioni, su 130 analizzati, che esibivano una concentrazione superiore al limite inferiore m senza però superare quello massimo M, mentre nessun campione analizzato presentava una concentrazione di *E. coli* superiore al limite massimo M.

Viene, di seguito riportato un grafico che riassume i risultati ottenuti:

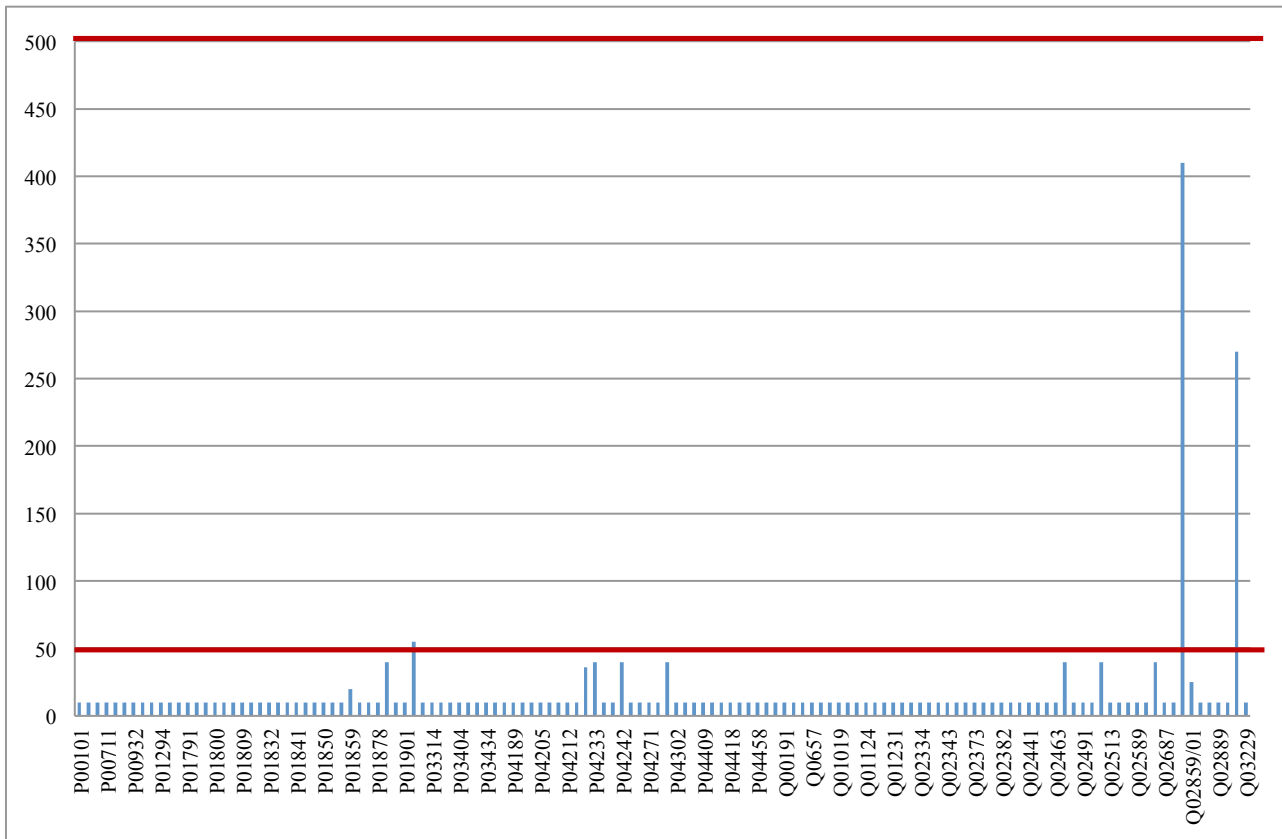


Figura 7

*Escherichia coli* (in ascissa ritroviamo i campioni analizzati e in ordinata UFC/g).

### Carica batterica mesofila:

La tabella sottostante riporta i risultati ottenuti della ricerca della carica batterica mesofila in carni macinate fresche:

Tabella 10  
Carica batterica mesofila

Campioni conformi	Campioni conformi ma a rischio	Campioni non conformi
63	44	23

Campioni conformi = < m, dove m è uguale a 500 000 UFC/g.

Campioni conformi ma a rischio = compresi tra 500 000 e 5 000 000 UFC/g.

Campioni non conformi = >M, dove M è uguale a 5 000 000 UFC/g.

Per quanto riguarda invece la carica batterica mesofila (CB), sono stati individuati 44 campioni su 130 che esibivano una carica microbica superiore al limite inferiore m senza però



superare quello massimo M e 23 campioni che superavano il livello massimo M previsto per legge.

Viene, di seguito riportato un grafico che riassume i risultati ottenuti:

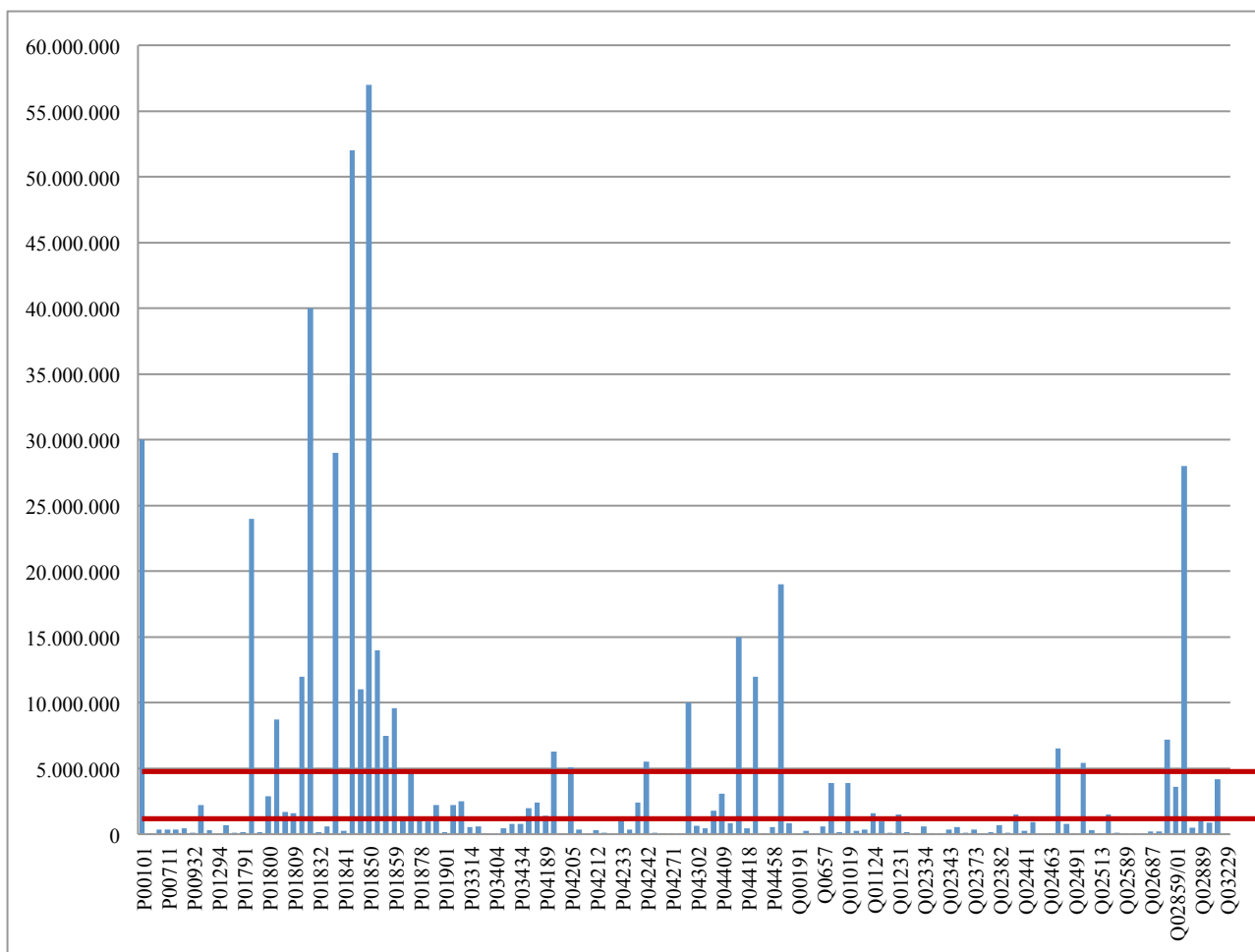


Figura 8

Carica batterica mesofila (in ascissa ritroviamo i campioni analizzati e in ordinata UFC/g).

**Salmonella spp.:**

La tabella sottostante riporta i risultati ottenuti dalla ricerca di *Salmonella spp.* in carni macinate fresche:

Tabella 11  
*Salmonella spp.*

Campioni conformi	Campioni non conformi
127	3

Campioni conformi = assente in 10 g di campione.

Campioni non conformi = presente in 10 g di campione.

Solamente 3 campioni, su 130 analizzati, sono risultati essere positivi per la presenza di *Salmonella spp.*

Viene, di seguito riportato un grafico che riassume i risultati ottenuti:

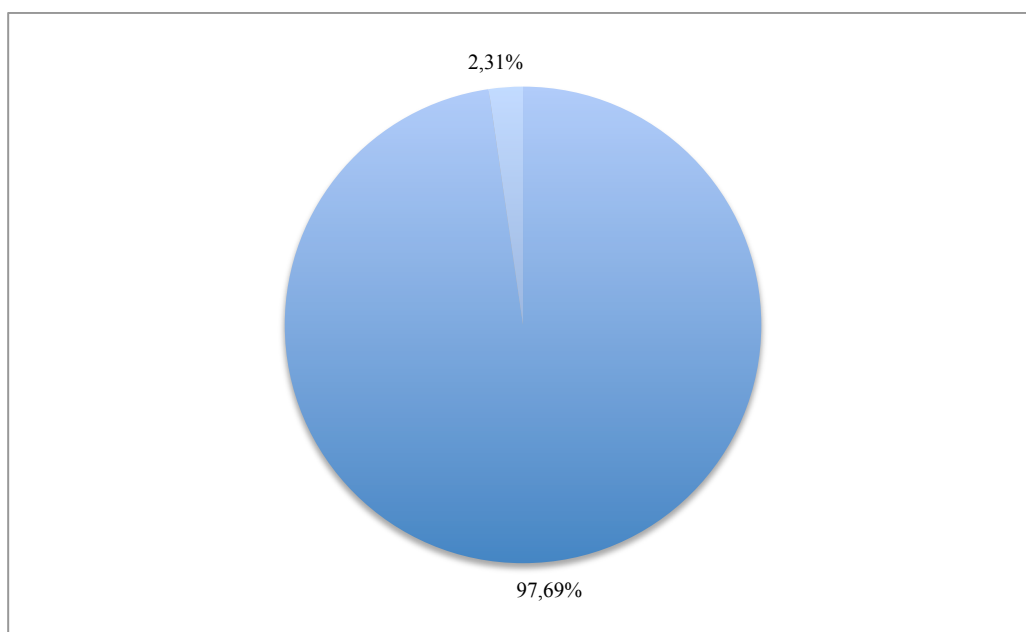


Figura 9  
*Salmonella spp.*

In conclusione, i dati ottenuti dal seguente studio e riportati nella Tabella 12, sono i seguenti:

Tabella 12  
Risultati a confronto

	<b>Campioni conformi</b>	<b>Campioni conformi ma a rischio</b>	<b>Campioni non conformi</b>
<i>E. coli</i>	127	3	0
Carica batterica	63	44	23
<i>Salmonella spp.</i>	127	/	3

Viene di seguito riportato un grafico che riassume la totalità dei risultati ottenuti mettendo a confronto i parametri presi in considerazione e riportando i valori in percentuale :

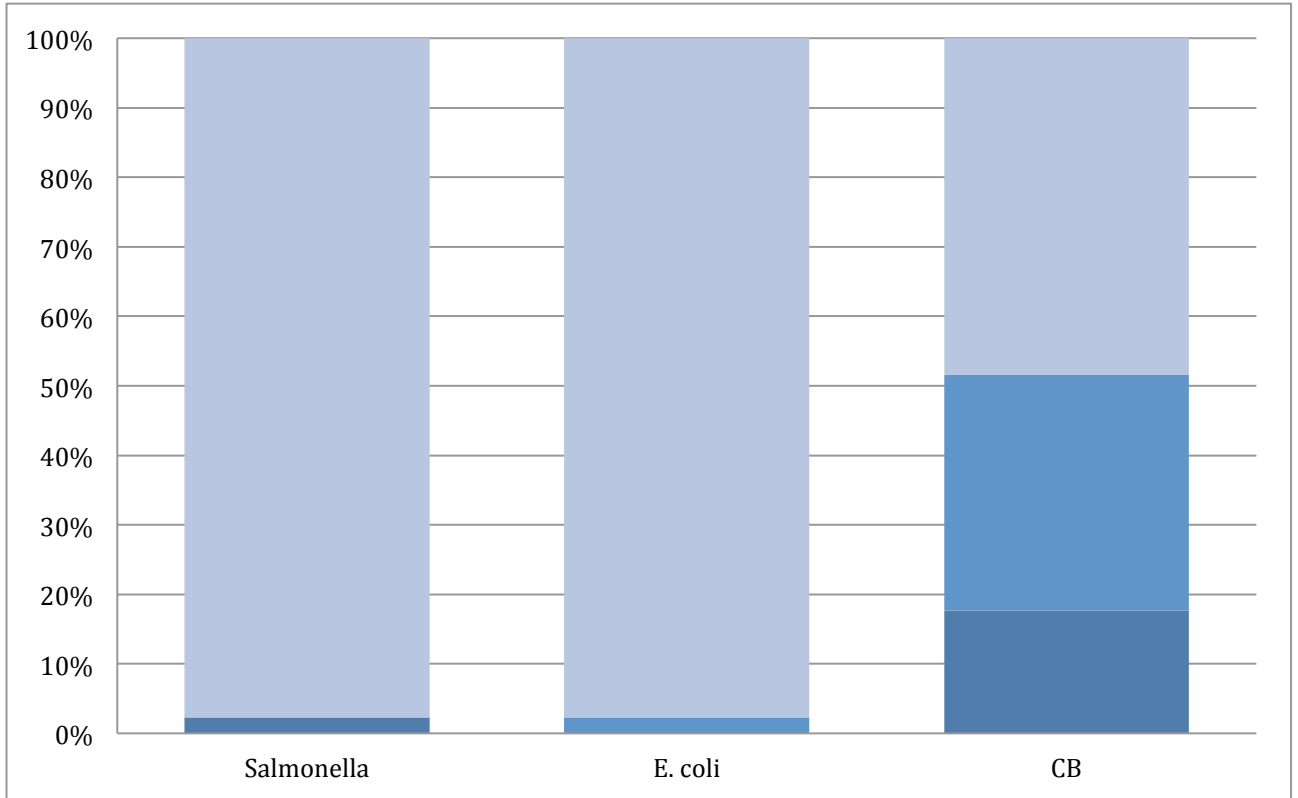


Figura 10  
Parametri a confronto.



## 5. CONCLUSIONI

La carne macinata si ottiene, in genere, per macinazione delle parti del quarto anteriore dei bovini di varie età (vitello, manzo, bovino adulto) senza l'aggiunta di altri ingredienti e di additivi, ad eccezione dell'acido citrico e sali. Si tratta di un prodotto altamente deperibile in quanto la macinazione determina la rottura delle barriere costituite dalla membrana cellulare, dal tessuto connettivo e dal grasso di copertura che, nella carne in carcassa e in grossi pezzi, si oppongono alla penetrazione dei microrganismi. L'alta deperibilità della carne macinata è dovuta anche ad una maggiore disponibilità per i germi dei nutrienti in seguito alla rottura delle cellule, ad una diffusione dei microrganismi superficiali all'interno della massa muscolare e ad una maggiore superficie esposta all'aria e quindi alla contaminazione. La qualità batteriologica delle carni macellate è in diretto rapporto con le contaminazioni che avvengono nel corso della produzione a partire dalla macellazione dell'animale fino al momento del consumo. Sono numerose le fonti che portano alla contaminazione del prodotto finito, i microrganismi presenti nella carne, infatti, hanno origini diverse e possono derivare da:

- ✓ Contaminazione del muscolo nell'animale vivo;
- ✓ Penetrazione nel muscolo nel corso della morte dell'animale <sup>26</sup>;
- ✓ Scuoiamento con passaggio di microrganismi dalla superficie della carcassa alla carne;
- ✓ L'eviscerazione per fuoriuscita del contenuto intestinale;
- ✓ La manipolazione o lavorazione della carne;
- ✓ Il trasporto;
- ✓ L'immagazzinaggio;
- ✓ La distribuzione <sup>26</sup>.

La contaminazione può essere di due tipi: profonda o superficiale. La contaminazione del muscolo ante-mortem, definita contaminazione profonda, è sempre molto limitata in quanto gli animali malati vengono sistematicamente eliminati dal Servizio Veterinario con i controlli ante- e post-mortem. La contaminazione profonda, nel caso di animali sani abbattuti in buone condizioni è molto bassa; mentre una contaminazione tutt'altro che trascurabile delle carcasse da parte dei batteri intestinali si può verificare molte ore dopo l'abbattimento, poiché la parete

intestinale permette l'ingresso dei batteri nel muscolo, motivo per cui, in condizioni abituali, l'eviscerazione viene eseguita entro trenta minuti dal dissanguamento.

Le principali fonti della contaminazione superficiale sono la pelle e il contenuto intestinale dell'animale per cui, in fase di macellazione, lo scuoiamento e l'eviscerazione devono essere eseguiti in modo accurato, ponendo particolare attenzione all'acqua usata per la docciatura, agli strumenti per il sezionamento e il disosso dell'animale, alle superfici di lavoro, alle attrezzature, in particolare il tritacarne, e agli operatori. L'uomo può rappresentare una fonte di contaminazione delle carni lungo tutto il corso della lavorazione<sup>27</sup>.

Nel valutare i risultati si è tenuto conto dei requisiti richiesti dalla normativa cogente e quindi dell'igiene dei luoghi di lavoro, delle attrezzature, del prodotto e del personale. Per la valutazione dei criteri microbiologici dei campioni di carne macinata bovina, sono stati adottati i limiti previsti dal Regolamento 2073/2005 e s.m.i..

Visti nel loro complesso, i risultati ottenuti configurano una situazione igienico-sanitaria soddisfacente, indice di una filiera controllata dal punto di vista sanitario, soprattutto se si tiene conto del fatto che in una buona parte degli esercizi considerati vengono detenute e lavorate grandi quantità di carni. Il reperimento di tali microrganismi, attualmente ubiquitari nei macelli e negli ambienti di lavorazione delle carni, può indicare una loro esistenza nella carne già nell'animale vivo (in particolare per salmonella) oppure una contaminazione diretta di tipo ambientale. Come per *E. coli* anche per *Salmonella spp.* la trasmissione avviene per via oro-fecale e, quindi, eventuali contaminazioni sono da attribuire al processo di macellazione o alla manipolazione da parte di operatori che non hanno seguito le corrette pratiche d'igiene. Un'ulteriore fonte di contaminazione è data dalle contaminazioni crociate che consistono ad esempio nell'utilizzare taglieri, coltelli o strumenti di lavorazione uguali per carni rosse e bianche. E' verosimile che, oltre alla corretta igiene di lavorazione, sulla frequenza di isolamento incida anche la stagione nella quale si effettuano i controlli: nei mesi caldi l'incidenza tende ad aumentare<sup>28</sup>.

Osservando i risultati ottenuti, nel complesso possiamo concludere che, se dal punto di vista igienico-sanitario i macinati freschi, commercializzati da macellerie ubicate in provincia di Vicenza, non presentano anomalie rilevanti e possono quindi essere consumati con tranquillità, questo non vale per l'igiene di processo. Ha destato qualche preoccupazione il rinvenimento di microrganismi potenzialmente patogeni per i possibili rischi di contaminazione crociata ipotizzabili<sup>28</sup>. L'isolamento di microrganismi, come *E. coli* e carica batterica mesofila, indicano un processo produttivo igienicamente non del tutto sotto controllo. La presenza di *E. coli* in un alimento denota una contaminazione di tipo fecale

piuttosto recente o una contaminazione avvenuta attraverso un substrato che ne ha permesso la sopravvivenza, in quanto si tratta di un microrganismo, che rispetto agli altri coliformi, sopravvive meno a lungo in ambiente esterno<sup>27</sup>. Tale contaminazione può derivare da un processo di macellazione che non viene eseguito in modo ottimale o depone sempre a favore di una cattiva igiene di produzione. La presenza di carica batterica mesofila indica invece la mancanza dei requisiti igienici a livello di processo. Eventuali contaminazioni sono da attribuire ad attrezzature, macchinari e strumenti che non vengono puliti con la frequenza e l'accuratezza necessarie per prevenire l'accumulo progressivo dei microrganismi<sup>29</sup>. Le condizioni igieniche degli ambienti di lavoro, delle apparecchiature e degli utensili impiegati nella lavorazione dei suddetti prodotti alimentari giocano un ruolo non secondario nel determinare la contaminazione microbica complessiva degli alimenti<sup>30</sup>. Ci sembra utile rimarcare che il prelievo di campioni microbiologici da superfici ambientali, utensili e personale lavorante è un utile supporto diagnostico per giudicare meglio il livello di igienicità applicato in un determinato esercizio commerciale. Il rispetto della massima igienicità nella lavorazione di simili prodotti è un presupposto essenziale per garantire elevati livelli di qualità microbiologica a queste derrate<sup>15</sup>.

Il riscontro di campioni non conformi, anche se in minima quantità, ci ha permesso di evidenziare alcune lacune organizzative nel corso della lavorazione e di suggerire i dovuti correttivi, insieme ad interventi straordinari di pulizia e disinfezione delle superfici, degli ambienti, delle attrezzature e degli utensili.

Si può quindi affermare che nel settore della produzione e della vendita di carni macinate bovine, è necessario un miglioramento della qualità igienica. Per un miglioramento della qualità igienica sarebbe opportuno esaminare in dettaglio il processo di trasformazione che, partendo dalla materia prima, porta al prodotto finito, individuando in tal modo le potenziali fonti di contaminazione.

Le macellerie non possono ignorare le esigenze dei consumatori, sempre più consapevoli e sensibili ai temi della qualità alimentare e della salute. Per migliorare la qualità igienica gli OSA dovrebbero curare in modo puntuale alcuni aspetti. In primo luogo, porre maggiore attenzione alla formazione e all'igiene del personale (utilizzo di camici adeguati, copricapo, guanti, etc.). Altrettanto importanti sono l'igiene delle materie prime e una maggiore attenzione all'igiene delle attrezzature di lavoro.

Gli OSA dovrebbero possedere, e applicare, in maniera puntuale, un valido manuale di autocontrollo. Dalla nostra indagine è, infatti, emerso che l'OSA considera le procedure basate sui principi HACCP, come una sorta d'obbligo utile solo per essere in regola con i

controlli ufficiali, effettuati dall'Autorità Competente, e non come uno strumento utile che consente di controllare i pericoli inerenti gli alimenti prodotti e commercializzati. Considerato che la predisposizione, l'attuazione ed il mantenimento di tali procedure sono obbligatorie dal 1997, si impone una riflessione in merito, finalizzata ad un'opera di formazione rivolta agli operatori <sup>31</sup>. Dobbiamo quindi porre la massima cura, in fase di vigilanza, per stimolare i responsabili e gli operatori di queste strutture commerciali ad applicare al meglio le regole di una produzione igienicamente corretta.

In conclusione, possiamo affermare che la carne macinata bovina prodotta e commercializzata nelle macellerie della provincia di Vicenza fornisce garanzia di qualità e può essere consumata, nonostante le applicazioni non sempre adeguate, in tranquillità.



## APPENDICE A

Composizione dei terreni di coltura e reagenti utilizzati:

Vengono riportati di seguito i costituenti dei terreni (espressi in grammi) su litro di acqua deionizzata.

### Metodica UNI EN ISO 16649-2:2001 per la conta di *Escherichia coli* $\beta$ -glucuronidasi-positivo

BUFFERED PEPTONE WATER		
Peptone di carne	10,00	g/l
Sodio cloruro	5,00	g/l
Disodio fosfato	3,50	g/l
Monopotassio fosfato	1,50	g/l

TRYPTONE BILE X-GLUC AGAR - TBX		
Tryptone	20,00	g/l
Sali biliari n.3	1,50	g/l
Agar	14,00	g/l
X-gluc	0,075	g/l

### Metodica UNI EN ISO 4833:2004 per la conta di microorganismi

BUFFERED PEPTONE WATER		
Peptone di carne	10,00	g/l
Sodio cloruro	5,00	g/l
Disodio fosfato	3,50	g/l
Monopotassio fosfato	1,50	g/l

PLATE COUNT AGAR - PCA		
Triptone (Idrolizzato pancreatico di caseina)	5,00	g/l
Estratto di lievito	2,50	g/l
Glucosio	1,00	g/l
Agar	15,00	g/l

**Metodica UNI EN ISO 6579:2008 per la ricerca di *Salmonella spp.***

BUFFERED PEPTONE WATER		
Peptone di carne	10,00	g/l
Sodio cloruro	5,00	g/l
Disodio fosfato	3,50	g/l
Monopotassio fosfato	1,50	g/l

RAPPAPORT-VASSILIADIS SOYA PEPTONE BROTH - RVS		
Peptone di soia	4,50	g/l
Sodio cloruro	7,2	g/l
Potassio fosfato monobasico	1,26	g/l
Potassio fosfato bibasico	0,18	g/l
Magnesio cloruro	13,40	g/l
Verde malachite ossalato	0,036	g/l

MULLER-KAUFFMANN BROTH BASE - MKTTn		
Sodio tiosolfato. 5H <sub>2</sub> O	47,80	g/l
Calcio carbonato	38,70	g/l
Digerito enzimatico di caseina	8,60	g/l
Bile bovina	4,78	g/l
Estratto di carne	4,30	g/l
Sodio cloruro	2,60	g/l
Verde brillante	0,0096	g/l
Soluzione iodo-iodurata da aggiungere dopo bollitura a 50 °C	0,020	g/l

XYLOSE LYSINE DESOXYCHOLATE AGAR - XLD		
Estratto di lievito	3,00	g/l
Lisina	5,00	g/l
Saccarosio	7,50	g/l
Xilosio	3,50	g/l
Lattosio	7,50	g/l
Sodio desossicolato	2,50	g/l
Ferro ammonio citrato	0,80	g/l
Cloruro di sodio	6,80	g/l
Rosso fenolo	0,080	g/l
Agar	13,50	g/l

SALMONELLA SHIGELLA AGAR- SS		
Peptone	5,00	g/l
Estratto di carne	5,00	g/l
Lattosio	10,00	g/l
Sali biliari	8,50	g/l
Citrato di sodio	8,50	g/l
Tiosolfato di sodio	8,50	g/l
Citrato ferrico	1,00	g/l
Agar	12,25	g/l
Rosso neutro	0,025	g/l
Verde brillante	0,033	g/l

NUTRIENT AGAR		
Peptone	6,00	g/l
Estratto di carne	1,00	g/l
Estratto di lievito	2,00	g/l
Cloruro di sodio	5,00	g/l
Agar	14,00	g/l

KIT BIOCHIMICO PER SALMONELLA		
Urea	0,25	%
Arginine	1,0	%
Ornithine	1,0	%
Lysine	1,0	%
Aliphatic thiol	0,2	%
Fatty acid ester	1,0	%
Sugar aldehyde	1,0	%
Sorbitol	1,0	%
$\rho$ -nitrophenyl- $\beta$ ,D-glucuronide	0,1	%
$\sigma$ -nitrophenyl- $\beta$ ,D-galactoside	0,1	%
$\rho$ -nitrophenyl- $\beta$ ,D-glucoside	0,1	%
$\rho$ -nitrophenyl- $\beta$ ,D-xyloside	0,1	%
$\rho$ -nitrophenyl-n-acetyl- $\beta$ ,D-glucosaminide	0,1	%
Malonate	0,5	%
Proline- $\beta$ -naphthylamide	0,1	%
$\gamma$ -glutamy- $\beta$ -naphthylamide	0,1	%
Pyrrolidonyl- $\beta$ -naphthylamide	0,1	%
Adonitol	1,0	%
Tryptophane	0,4	%

## APPENDICE B

Vengono riportati di seguito i risultati ottenuti per ciascun campione, relativi ad ogni parametro ricercato.

<b>N. CAMPIONE</b>	<b><i>E. COLI</i></b>	<b>CARICA BATTERICA</b>	<b><i>SALMONELLA SPP.</i></b>
P00101	<10	>30000000	ASSENTE
P00219	<10	74000	ASSENTE
P00510	<10	330000	ASSENTE
P00711	<10	330000	ASSENTE
P00926	<10	370000	ASSENTE
P00929	<10	450000	ASSENTE
P00932	<10	100000	ASSENTE
P00983	<10	2200000	ASSENTE
P00986	<10	310000	ASSENTE
P01294	<10	350	ASSENTE
P01300	<10	670000	ASSENTE
P01780	<10	110000	ASSENTE
P01791	<10	140000	ASSENTE
P01794	<10	24000000	ASSENTE
P01797	<10	180000	ASSENTE
P01800	<10	2900000	ASSENTE
P01803	<10	8700000	ASSENTE
P01806	<10	1700000	ASSENTE
P01809	<10	1600000	ASSENTE
P01812	<10	12000000	ASSENTE
P01815	<10	40000000	ASSENTE
P01832	<10	150000	ASSENTE
P01835	<10	580000	ASSENTE
P01838	<10	29000000	ASSENTE
P01841	<10	240000	ASSENTE
P01844	<10	52	ASSENTE
P01847	<10	11000000	ASSENTE
P01850	<10	57000000	ASSENTE
P01853	<10	14000000	ASSENTE
P01856	<10	7500000	ASSENTE
P01859	20	9600000	ASSENTE
P01864	<10	1100000	ASSENTE
P01867	<10	4800000	ASSENTE
P01878	<10	1100000	ASSENTE

P01881	<40	960000	ASSENTE
P01884	<10	2200000	ASSENTE
P01901	<10	150000	ASSENTE
P01904	55	2200000	ASSENTE
P02178	<10	2500000	ASSENTE
P03314	<10	560000	ASSENTE
P03397	<10	590000	ASSENTE
P03400	<10	35000	ASSENTE
P03404	<10	75000	ASSENTE
P03427	<10	450000	ASSENTE
P003430	<10	800000	ASSENTE
P03434	<10	800000	ASSENTE
P03471	<10	2000000	ASSENTE
P03474	<10	2400000	ASSENTE
P04189	<10	1400000	ASSENTE
P04196	<10	6300000	ASSENTE
P04202	<10	65000	ASSENTE
P04205	<10	5100000	ASSENTE
P04208	<10	370000	ASSENTE
P04211	<10	55000	ASSENTE
P04212	<10	310000	ASSENTE
P04227	<10	130000	ASSENTE
P04230	36	15000	ASSENTE
P04233	<40	1200000	ASSENTE
P04236	<10	340000	ASSENTE
P04239	<10	2400000	ASSENTE
P04242	<40	5500000	ASSENTE
P04265	<10	100000	ASSENTE
P04268	<10	<10000	ASSENTE
P04271	<10	54000	ASSENTE
P04274	<10	79000	ASSENTE
P04277	<40	10000000	PRESENTE
P04302	<10	640000	ASSENTE
P04305	<10	430000	ASSENTE
P04308	<10	1800000	ASSENTE
P04409	<10	3100000	ASSENTE
P04412	<10	830000	ASSENTE
P04415	<10	15000000	ASSENTE
P04418	<10	450000	ASSENTE
P04421	<10	12000000	ASSENTE
P04424	<10	6400	ASSENTE
P04458	<10	560000	ASSENTE
P04461	<10	19000000	ASSENTE
P04469	<10	850000	ASSENTE

Q00191	<10	37000	ASSENTE
Q00277	0	260000	ASSENTE
Q0605	<10	910	ASSENTE
Q0657	<10	610000	ASSENTE
Q01012	<10	3900000	ASSENTE
Q01015	<10	140000	ASSENTE
Q01019	<10	3900000	ASSENTE
Q01097	<10	240000	ASSENTE
Q01101	<10	330000	ASSENTE
Q01124	<10	1600000	ASSENTE
Q01127	<10	970000	ASSENTE
Q01207	<10	130000	ASSENTE
Q01231	<10	1500000	ASSENTE
Q01951	<10	150000	ASSENTE
Q01952	<10	5500	ASSENTE
Q02334	<10	580000	ASSENTE
Q02337	<10	36000	ASSENTE
Q02340	<10	45000	ASSENTE
Q02343	<10	360000	ASSENTE
Q02367	<10	520000	ASSENTE
Q02370	<10	110000	ASSENTE
Q02373	<10	330000	ASSENTE
Q02376	<10	61000	ASSENTE
Q02379	<10	160000	ASSENTE
Q02382	<10	690000	ASSENTE
Q02435	<10	100000	ASSENTE
Q02438	<10	1500000	ASSENTE
Q02441	<10	270000	ASSENTE
Q02444	<10	930000	ASSENTE
Q02447	<10	16000	ASSENTE
Q02463	<10	15000	ASSENTE
Q02466	<40	6500000	ASSENTE
Q02469	<10	760000	ASSENTE
Q02491	<10	62000	ASSENTE
Q02494	<10	5400000	ASSENTE
Q02510	<40	280000	ASSENTE
Q02513	<10	34000	ASSENTE
Q02544	<10	1500000	ASSENTE
Q02547	<10	130000	ASSENTE
Q02589	<10	50000	ASSENTE
Q02592	<10	17000	ASSENTE
Q02595	<40	45000	ASSENTE
Q02687	<10	220000	ASSENTE
Q02691	<10	210000	ASSENTE

Q02859	410	7200000	PRESENTE
Q02859/01	25	3600000	PRESENTE
Q02883	<10	28000000	ASSENTE
Q02886	<10	490000	ASSENTE
Q02889	<10	1100000	ASSENTE
Q02892	<10	900000	ASSENTE
Q03006	270	4200000	ASSENTE
Q03229	<10	46000	ASSENTE



## BIBLIOGRAFIA

1. Decreto Legislativo 283/62, Disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari.
2. Sicurezzaalimentare.net (internet).  
Disponibile all'indirizzo <http://www.sicurezzaalimentare.net>
3. Marinelli, Liguori, Montemarano, D'Amora, Igiene, Medicina Preventiva e Sanità Pubblica, Piccin Editore, 269-273, 2002.
4. Nutritionvalley.it (internet). Intossicazione e tossinfezione alimentare, 7 Dicembre 2010.  
Disponibile all'indirizzo <http://www.nutritionvalley.it>
5. Sicurezzaalimentare.it (internet). Malattie alimentari da microrganismi patogeni.  
Disponibile all'indirizzo <http://www.sicurezzaalimentare.it>
6. A S.F., C M.L., S D.L., Emerging Foodborne Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, a. III, n. 3, 285-293, July-September 1997.
7. Efsa.europa.eu (internet).  
Disponibile all'indirizzo <http://www.efsa.europa.eu>
8. Decreto Ministeriale 15 Dicembre 1990, G.U. n.6 8/1/1991.
9. Epicentro.iss.it (internet), Malattie infettive, Salmonella.  
Disponibile all'indirizzo <http://www.epicentro.iss.it>
10. Salute.gov.it (internet), Dati epidemiologici.  
Disponibile all'indirizzo <http://www.salute.gov.it>
11. De Felip G., Recenti sviluppi di igiene e microbiologia degli alimenti, Tecniche nuove, 41-43, 691-706, 2001.
12. A G., O. F., Manuale della sicurezza microbiologica degli alimenti e delle acque. Fondamenti scientifici e normativi dell'autocontrollo, Dicembre 2002.
13. Andreatta D., Scipioni A., Il sistema HACCP. Sicurezza e qualità nelle aziende agroalimentari, Milano, Editore Ulrico Hoepli, 3-33, 1997.
14. Direttiva comunitaria 43/93, L. n.56 del 6/2/96 e Decreto legislativo n.155 del 26/5/97, ora sostituito dai regolamenti 852-853 e 854 CE del 2004.
15. B E., B S., F GM., G G., Igiene e medicina preventiva. Igiene, sanità pubblica, igiene ambientale e medicina di comunità, Monduzzi Editore, volume 2, 681-688, 1994.
16. Codex alimentarius commission (CAC) on food hygiene. Guidelines for the application of the hazard analysis critical control point (HACCP) system, Alinorm 93/13°, Appendix 2, Food Organisation (FAO)/World Health Organisation (WHO), Roma, 1993.

17. A G., O F., Fondamenti scientifici e normativi dell'autocontrollo, New Graphic, 15-16, 62, 168, 2002.
18. Pacchetto igiene.it (internet).  
Disponibile all'indirizzo <http://www.pacchettoigiene.it>
19. Regolamento (CE) N.1441/2007 della commissione del 5 dicembre 2007 che modifica il Regolamento (CE) N. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, capitolo 1.1.6.
20. Regolamento (CE) N.1441/2007 della commissione del 5 dicembre 2007 che modifica il Regolamento (CE) N. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, Capitolo 2.1.6.
21. Articolo 4 del Regolamento 852/ 2004.
22. Il punto critico. Autocontrollo nelle macellerie, Dipartimento di prevenzione, Servizio di igiene degli alimenti e nutrizione, Milano.
23. Requisiti igienico-sanitari dei gelati artigianali, Industrie alimentari, Dicembre, 41-42, 2011.
24. Validazione, incertezza e assicurazione del dato analitico, Accredia, 2011.
25. L'accreditamento dei laboratori per la sicurezza alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma, 2005.
26. Metodi di analisi per il controllo microbiologico degli alimenti, Istituto Superiore di Sanità, Rapporti Istat, 1996
27. Indagini sulle condizioni igieniche di carne macinata del commercio, Industrie Alimentari, 371, 726-727, 1998.
28. Indagine sull'inquinamento microbiologico di carni fresche e utensili in macelleria, Industrie Alimentari, Dicembre, 1200-1211, 1993.
29. James J. Jay, David A. Golden, Martin J. Loessner, Microbiologia degli alimenti, Springer Editore, 67, 2005.
30. P G., C D., B MA., B B., M A., Indagine sulla contaminazione batteriologica dei ceppi da taglio di macelleria, Igiene moderna, 94, 897-910, 1990.
31. Requisiti igienico-sanitari dei gelati artigianali, Industrie alimentari, Dicembre, 41-42, 2011.