

VALUTAZIONE DELL'INFLUENZA DELLE TEMPERATURE DI RAFFREDDAMENTO POST-MACELLAZIONE SUI PARAMETRI IGIENICI PREVISTI DAL REGOLAMENTO CE 2073/2005 APPLICATI A COSCE SUINE

EVALUATION OF THE INFLUENCE OF PIG HAM POST – SLAUGHTERING REFRIGERATION ON HYGIENIC PARAMETERS SET IN REGULATION EC 2073/2005

Bassi L.¹, Bonardi S.¹, Brutti A.², Bacci C.¹, Boni E.¹, Alpigliani I.¹, Brindani F.¹

¹Dipartimento di Salute Animale, Università di Parma.

²Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari (SSICA) in Parma.

SUMMARY

In order to evaluate the influence of refrigeration on hygienic parameters, issued by EC Regulation n. 2073:2005 (amended by EC Regulation n. 1441:2007) for swine carcasses, 15 pig hams were tested for microbiological analysis, *i.e.* enumeration of microorganisms at 30°C and enumeration of enterobacteriaceae. Ham swabbing was carried out at the end of slaughtering and after 24 hours of storing in refrigeration cells. The temperature-monitoring recorders were put in the hams at the end of cutting operations of carcasses, when the hams were placed in the refrigeration cells. The drop in the inner temperature of hams was monitored during the 24-hour storing time. In most cases, hams with an increase of background flora after 24 hours, had lower temperature at the beginning of refrigeration and the inner temperature need a shorter time to drop below 20°C, 10°C and 4°C, rather than hams associated with bacterial reduction. Therefore there was no correlation between dropping of temperature and bacterial load of hams, because the hygienic conditions of cutting operations prior to refrigeration have a greater influence on hygienic parameters than refrigeration alone.

KEYWORDS

slaughtering, pig, ham, refrigeration, Regg. EC 2073:2005 / 1441:2007.

INTRODUZIONE

Il Regolamento CE n. 2073 del 2005 sui “criteri microbiologici applicabili agli alimenti” (1), modificato dal Regolamento CE n. 1441 del 2007 (2), individua come indicatori igienici del processo di macellazione la numerazione dei microrganismi a 30°C e delle enterobatteriacee. Tali criteri di igiene di processo, che sono applicabili alle carcasse al termine della macellazione e prima del raffreddamento, non tengono conto, pertanto, della contaminazione che si può verificare durante il successivo sezionamento delle mezzene e dell'effetto della refrigerazione finale. Queste fasi potrebbero influire sui livelli

di contaminazione batterica delle carni fresche, come le cosce suine destinate alla produzione di prosciutto crudo. Infatti, durante le operazioni di sezionamento si verificano inevitabilmente ulteriori contaminazioni microbiche, contenibili in parte rispettando le buone pratiche igieniche (GHP) e sanificando gli utensili e le attrezzature. D'altra parte, la temperatura di raffreddamento è sicuramente da ritenersi fattore critico per contenere la crescita batterica. Questo studio, quindi, si pone lo scopo di verificare l'evoluzione dei criteri igienici per le cosce suine a distanza di 24 ore dalla macellazione, dopo che le carcasse sono state sezionate per ottenere i diversi tagli carnei ed è avvenuto il completo

raffreddamento delle cosce. In ultima analisi, si vuole valutare l'influenza che hanno diverse curve di raffreddamento sulla crescita batterica ed individuare, se possibile, eventuali fattori di rischio.

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso Febbraio e Giugno 2010, sono state compiute 8 sessioni di campionamento presso un impianto di macellazione di suini di dimensioni medio - grandi sito in provincia di Mantova. Si sono campionate in totale 15 cosce (2 cosce per sessione, tranne la prima visita). Si è utilizzato un metodo di campionamento non distruttivo basato sull'impiego di "sponge" sterili (TWIRL'EM®) per la numerazione dei microrganismi a 30°C e la numerazione delle enterobatteriacee. È stata considerata un'area di 100 cm² utilizzando un delimitatore metallico sterilizzabile a 82°C dopo ogni operazione, nelle apposite coltelliere. Per le modalità di campionamento superficiale, si è fatto riferimento alla norma ISO 18593:2004 (3). Le spugne sono state reidratate con 10 ml di soluzione sterile peptone - sale (SOLP; codice CM0982, Oxoid), in accordo con la norma UNI EN ISO 6887-1:2000 (4), ed è stato eliminato il liquido in eccesso. Le spugne sono state strofinate su 100 cm² per coscia per un tempo minimo di 15 secondi, con movimenti orizzontali, verticali e obliqui, mantenendo un angolo di 45 gradi e cambiando la faccia della spugna dopo ogni passaggio in una specifica direzione. Il campionamento è stato effettuato sulle mezzene dopo la macellazione, ma prima della refrigerazione, ed è stato ripetuto a distanza di 24 ore. Quest'ultima fase del campionamento ha avuto luogo dopo il sezionamento delle carcasse, eseguito nei locali annessi all'impianto di macellazione, sulle cosce separate dalla carcassa, completamente raffreddate con temperatura interna inferiore a 4°C. I campioni, rappresentati dai tamponi superficiali, sono stati trasportati al Laboratorio di Microbiologia degli Alimenti della Sezione di Ispezione entro 4 ore dal prelievo, a temperatura compresa tra 1°C e 4°C, e analizzati senza indebito ritardo. In totale sono stati testati 30 campioni appartenenti a 15 cosce suine. Ad ogni spugna sono stati aggiunti 90 ml di SOLP per ottenere il rapporto di 100 ml per 100 cm² nella sospensione iniziale del campione, come specificato dalla norma ISO 18593:2004 (3). Seguendo la norma UNI EN ISO 6887-1:2000 (4), a partire dalla sospensione madre sono state ottenute le diluizioni decimali seriali successive. Per la conta dei microrganismi a 30°C si è fatto riferimento al metodo EN ISO 4833:2003 (5), impiegando il terreno Plate Count Agar (PCA; CM0587, Oxoid) e incubando le piastre a 30°C ± 1°C per

72 ore ± 3ore. Per la numerazione delle enterobatteriacee si è seguita la norma ISO 21528-2:2004 (6), impiegando il terreno selettivo - differenziale Violet Red Bile Glucose Agar (VRB-GA; CM0978, Oxoid), incubato a 37°C per 24 ore ± 2 ore. Le colonie caratteristiche sono state confermate come enterobatteriacee sottoponendole al test per l'ossidasi, utilizzando dischetti commerciali (191040, Biolife) contenenti il reattivo fenilenediamina, e al test di fermentazione, utilizzando un brodo nutritivo contenente rosso fenolo (401940, Biolife) e l'1% di glucosio (LP0071, Oxoid). Le temperature delle cosce suine sono state misurate con rilevatori di temperatura tarati (TEMPSTICK® System, TECNO-Soft), le cui sonde sono state inserite in profondità nel muscolo mediale per registrare la temperatura a cuore del prodotto. Le sonde sono state posizionate all'interno delle cosce, una volta terminata la fase di asportazione dalla mezzena, al momento dell'ingresso nelle celle di refrigerazione. A distanza di 24 ore, dopo che sono stati ripetuti i tamponi superficiali sulle cosce, le sonde sono state rimosse e le registrazioni sono state trasferite su supporto informatico (MS Office 2007) ed elaborate per ottenere le relative curve di raffreddamento di ciascuna coscia.

RISULTATI

Per quanto riguarda la numerazione dei microrganismi a 30°C (CMT) (tabella 1), il valore di contaminazione medio delle 15 cosce subito dopo la macellazione è stato pari a 2,57 log UFC/cm², con una deviazione standard di 0,60 unità logaritmiche ed intervalli di confidenza (IC) di ± 0,01 log UFC/cm² ($p < 0,05$). Il livello di contaminazione inferiore è stato di 1,60 log UFC/cm², mentre quello superiore è stato di 3,81 log UFC/cm². Il livello medio di CMT rilevato sulle medesime cosce a distanza di 24 ore è stato pari a 2,74 log UFC/cm² (IC ± 0,01 log UFC/cm², $p < 0,05$), con una deviazione standard pari a 0,58 log UFC/cm², un valore massimo di 4,08 log UFC/cm² e uno minimo di 1,92 log UFC/cm². La differenza tra le medie delle CMT subito dopo la macellazione (T_0) e dopo 24 ore (T_{+24}), considerando le 15 cosce, non si è rivelata statisticamente significativa secondo il test t. In 9 casi c'è stato un aumento della CMT tra il T_0 e il T_{+24} , di cui 5 (C2, C3, C4, C5, C7) hanno visto un aumento statisticamente significativo ($p < 0,01$) con un valore t di 0,0007. Nei rimanenti 6 casi, invece, c'è stata una diminuzione di CMT e in 4 casi (C10, C12, C13, C14) la diminuzione è stata statisticamente significativa per una probabilità inferiore a 0,01, avendo un valore t pari a 0,0071.

Per quanto riguarda la numerazione delle ente-

robatteriacee (tabella 1), i livelli di contaminazione, sia a T_0 che a T_{+24} , nella maggior parte dei casi (rispettivamente 12 casi su 15 a T_0 e 10 su 15 a T_{+24}) sono stati inferiori a $0,04 \log \text{ UFC/cm}^2$, soglia di rilevabilità del metodo analitico. A T_0 il valore più alto di enterobatteriacee è stato di $1,18 \log \text{ UFC/cm}^2$, mentre a T_{+24} è stato di $0,76 \log \text{ UFC/cm}^2$. In 3 cosce (C1, C2, C3) c'è stata una diminuzione dei livelli di enterobatteriacee e in 4 (C7, C8, C9, C15) invece c'è stato un aumento, ma non è stata possibile un'elaborazione statistica per i livelli di contaminazione molto bassi e l'elevata frequenza dei risultati inferiori alla soglia di rilevazione. Solo in un caso (C7) l'aumento di CMT tra T_0 e T_{+24} si è associato ad un aumento anche del valore numerico di Enterobacteriaceae.

La media delle temperature delle cosce registrata al T_0 è stata pari a $31,92^\circ\text{C}$ (IC 95% $\pm 0,05^\circ\text{C}$), con un valore minimo di $26,31^\circ\text{C}$, nella coscia n. 4, e un valore massimo di $36,51^\circ\text{C}$, nella n. 7. Le cosce, inoltre, hanno raggiunto in media una temperatura inferiore a 20°C , 10°C e 4°C rispettivamente in 142,73 minuti (min. - max. 57-286 minuti), in 536,87 minuti (min. - max. 383-700

minuti) e in 906,53 minuti (min. - max. 755-1070 minuti). Le cosce che hanno visto un aumento della CMT tra il T_0 e il T_{+24} (C2, C3, C4, C5, C7) hanno registrato in media una temperatura iniziale di $30,47^\circ\text{C}$ e hanno raggiunto una temperatura inferiore a 20°C , 10°C e 4°C rispettivamente a 126,2 minuti, 496,4 minuti e 863,8 minuti. I valori minimi sono stati riscontrati nella coscia n. 4 ($26,31^\circ\text{C}$, 57 minuti, 383 minuti, 755 minuti) mentre quelli massimi nella coscia n. 7 ($36,51^\circ\text{C}$, 286 minuti, 700 minuti, 1070 minuti). Le cosce che hanno visto una diminuzione della CMT tra il T_0 e il T_{+24} (C10, C12, C13, C14) hanno registrato in media una temperatura iniziale di $33,54^\circ\text{C}$ e hanno raggiunto una temperatura inferiore a 20°C , 10°C e 4°C rispettivamente a 178 minuti, 592,75 minuti e 959,75 minuti. I valori minimi sono stati riscontrati nella coscia n. 14 ($30,44^\circ\text{C}$, 118 minuti, 485 minuti, 873 minuti), mentre quelli massimi nella coscia n. 10 (temperatura iniziale di $35,42^\circ\text{C}$ e 205 minuti per raggiungere una temperatura $<10^\circ\text{C}$) e nella coscia n. 13 (700 e 1070 minuti per raggiungere temperature inferiori a 10°C e 4°C).

Tabella 1

coscia	CMT		enterobatteriacee		Temperatura ($^\circ\text{C}$)		Tempo (min)		
	T_0	T_{+24}	T_0	T_{+24}	T_0	T_{+24}	$<20^\circ\text{C}$	$<10^\circ\text{C}$	$<4^\circ\text{C}$
C1	2,95	2,71	0,70	$<0,04$	29,01	0,6	80	419	792
C2	1,78	3,04	$<0,04$	$<0,04$	31,54	0,99	128	584	965
C3	2,60	3,52	1,18	$<0,04$	28,69	0,01	74	400	766
C4	2,36	3,40	0,70	0,56	26,31	0,15	57	383	755
C5	2,63	4,08	$<0,04$	$<0,04$	29,32	-0,19	86	415	763
C6	1,72	1,92	$<0,04$	$<0,04$	33,28	1,52	136	602	982
C7	1,60	2,41	$<0,04$	0,30	36,51	2,06	286	700	1070
C8	2,69	2,76	$<0,04$	0,15	32,82	1,83	170	591	985
C9	2,38	2,34	$<0,04$	0,56	34,40	0,5	142	501	834
C10	2,94	1,99	$<0,04$	$<0,04$	35,42	1,26	205	589	949
C11	2,08	2,43	$<0,04$	$<0,04$	32,08	1,7	136	581	975
C12	3,26	2,61	$<0,04$	$<0,04$	35,27	1,23	199	604	950
C13	3,81	2,73	$<0,04$	$<0,04$	33,04	2,13	190	693	1067
C14	2,88	2,32	$<0,04$	$<0,04$	30,44	1,13	118	485	873
C15	2,87	2,90	$<0,04$	0,76	30,65	1,02	134	506	872

Nella parte sinistra sono indicati i valori della conta dei microrganismi a 30°C e delle enterobatteriacee, espressi in unità logaritmiche per cm^2 ; nella parte destra sono riportate le temperature delle cosce al T_0 e a T_{+24} , nonché i tempi di raggiungimento, espressi in minuti, delle temperature target relative alle curve di abbattimento della temperatura interna delle cosce.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Le analisi microbiologiche sono un elemento essenziale per la validazione e la verifica periodica dei limiti critici identificati nel contesto di un piano di Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP). Senza un'adeguata validazione/verifica non c'è la garanzia che il piano sia in grado di gestire i pericoli per la salute del consumatore. Gli indicatori microbiologici quanti-

tativi possono essere uno strumento molto efficace in un'ottica di verifica della adeguata implementazione del sistema HACCP e la scelta di indicatori appropriati è specifica del prodotto e del processo oggetto di studio. Pertanto, i test selezionati dovrebbero fornire informazioni significative che possano indirizzare gli sforzi compiuti verso la prevenzione dei pericoli e il miglioramento del sistema (7). Le informazioni ricavate dalle analisi microbiologiche possono aiutare a monitorare l'efficacia delle Procedure Standard di Sanificazione (SSOP), a valutare il

rischio che un pericolo di verifici, a stabilire limiti critici e a definire la sicurezza di un prodotto alimentare. In sintesi, sebbene le attività di audit sulle registrazioni del piano HACCP siano lo strumento primario per la verifica, il campionamento microbiologico può comunque avere un ruolo importante (8). La CMT è spesso scelta come un indicatore per verificare l'efficacia dei piani HACCP e delle buone pratiche igieniche, perché i dati relativi alla numerazione dei microrganismi aerobi sono raccolti più facilmente rispetto ai dati di microrganismi patogeni o di altri indicatori batterici. Tuttavia, non è unanimemente riconosciuto che la CMT sia effettivamente attendibile per verificare la corretta applicazione di un piano HACCP. Per questo motivo le enterobatteriacee sono spesso utilizzate come indicatori igienici per gli alimenti di origine animale (9). In particolare, valori elevati di contaminazione di enterobatteriacee dopo la refrigerazione, in occasione di diversi giorni di campionamento, sono legati a scarsa igiene che si riflette nella contaminazione di superfici e attrezzature nei locali di sezionamento (10). Nonostante queste considerazioni, generalmente la CMT è ritenuta sufficientemente indicativa per gli impianti di sezionamento delle carni suine (11), soprattutto nella fattispecie del presente studio dove i livelli di contaminazione da enterobatteriacee sono stati nella maggior parte dei casi sotto la soglia di rilevabilità. Solo per la coscia n. 7, infatti, CMT ed enterobatteriacee hanno avuto un aumento concorde a T_{+24} . Questa divergenza tra i 2 parametri igienici considerati potrebbe essere dovuta al fatto che le mani degli operatori sono contaminate, per la maggior parte, dalla flora batterica della cute, costituita essenzialmente da micrococchi, stafilococchi, batteri propionici e corynebatteri, microrganismi non facenti parte della famiglia *Enterobacteriaceae* (12). Come dimostrato da altri studi (13), le enterobatteriacee sono riscontrate in basse cariche sui prosciutti dopo la refrigerazione, mentre si registrano alti livelli di contaminazione per quanto riguarda le superfici a contatto con gli alimenti nei locali di sezionamento.

Confrontando tra loro le curve di abbattimento termico delle cosce in cui vi è stata una riduzione dei valori di CMT con quelle che hanno registrato un aumento, appare evidente che nella maggior parte dei casi le prime, in linea generale, hanno temperature a T_0 e tempi di abbattimento termico più elevati rispetto alle altre. L'aumento della CMT nelle cosce n. 2, n. 3, n. 4 e n. 5, non può essersi verificato durante la permanenza nelle celle di refrigerazione, in quanto la proliferazione della flora batterica generica, a temperature di refrigerazione, non

avviene prima di 72 ore (14). L'eccezione a questa tendenza è stata osservata nella coscia n. 7, che ha registrato i valori più elevati sia di temperatura iniziale che di abbattimento termico, sebbene rientri nel gruppo delle cosce che hanno avuto un aumento della CMT e delle enterobatteriacee tra T_0 e T_{+24} . La curva di riduzione della temperatura della coscia n. 7, inoltre, ha evidenziato una forte irregolarità e mostra forti oscillazioni di temperatura nel corso delle 24 ore, in controtendenza rispetto alle curve relative alle altre 14 cosce, caratterizzate da una spiccata linearità con un calo costante della temperatura.

Tali osservazioni consentono di supporre che nelle prime 24 ore post-macellazione la refrigerazione non sia il fattore più importante per prevenire l'aumento delle cariche batteriche e che le fasi precedenti, comprese tra il termine della macellazione e la refrigerazione (in particolare il sezionamento delle mezzene), abbiano un'influenza maggiore. I fattori che potrebbero aver inciso negativamente sulla qualità igienica delle cosce, che hanno presentato aumenti della CMT, potrebbero essere connessi alla mancata applicazione delle buone pratiche igieniche (GHP) da parte del personale addetto al sezionamento. Diversi batteri sono in grado di aderire alle superfici a contatto con gli alimenti e successivamente contaminare i prodotti alimentari durante le operazioni di produzione. Le attrezzature e le superfici quindi possono rappresentare una importante fonte di contaminazione, qualora non venissero efficacemente pulite e sanificate o se fossero lasciate bagnate tra le operazioni di pulizia e l'uso seguente (15).

Tuttavia, occorre sottolineare che la refrigerazione, seppure in questo studio non appaia come il fattore più determinante, riveste un'importanza strategica per contenere la moltiplicazione batterica. La refrigerazione è ritenuta strumento indispensabile per prevenire la crescita dei batteri mesofili, patogeni, la germinazione delle spore e lo sviluppo dei microrganismi psicrotrofi, tanto che un controllo inadeguato della temperatura di raffreddamento viene indicato tra le cause più comunemente associate a malattie a trasmissione alimentare e al deperimento degli alimenti (16). Questa considerazione è avvalorata dai risultati relativi alla coscia n. 7, per la quale il peggioramento delle condizioni igieniche può ritenersi imputabile ad una scorretta gestione della refrigerazione.

BIBLIOGRAFIA -

1. Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimen-

- tari (Gazz. Uff. Unione Europea n° L338 del 22/12/2005).
2. 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 (Gazz. Uff. Unione Europea n° L322 del 07/12/2007).
 3. ISO 18593: First edition 01-06-2004, Microbiology of food and animal feeding stuff – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
 4. UNI EN ISO 6887-1: Dicembre 2000, Preparazione dei campioni di prova, sospensione iniziale e diluizioni decimali per l'analisi microbiologica- Regole generali per la preparazione della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali.
 5. EN ISO 4833: Febbraio 2003, Metodo orizzontale per la conta di microrganismi – Tecnica della conta delle colonie a 30°C.
 6. ISO 21528-2: First edition 15-08-2004, Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony-count method.
 7. Swanson K. M., Anderson J. E. (2000). Industry perspectives on the use of microbial data for hazard analysis and critical control point validation and verification. *J. Food. Prot.*; 63 (6):815-8.
 8. Kvenberg J. E., Schwalm D. J. (2000). Use of microbial data for hazard analysis and critical control point verification--Food and Drug Administration perspective. *J. Food. Prot.*; 63 (6): 810-4.
 9. Jordan D., Phillips D., Sumner J., Morris S., Jenson I. (2007). Relationships between the density of different indicator organisms on sheep and beef carcasses and in frozen beef and sheep meat. *J. Appl. Microbiol.*; 102 (1): 57-64.
 10. Prendergast D. M., Duggan S. J., Fanning S., Cormican M., Gonzales-Barron U., Butler F., Duffy G. (2008). Prevalence and numbers of *Salmonella* spp. and Enterobacteriaceae on pork cuts in abattoirs in the Republic of Ireland. *J. Appl. Microbiol.*; 105 (4): 1209-19.
 11. Hong C. H., Todd E. C., Bahk G. J. (2008). Aerobic plate counts as a measure of hazard analysis critical control point effectiveness in a pork processing plant. *J. Food Prot.*; 71 (6): 1248-52.
 12. Aarnisalo K., Tallavaara K., Wirtanen G., Maijala R. e Raaska L. (2006). The hygienic working practices of maintenance personnel and equipment hygiene in the Finnish food industry. *Food. Control.*; 17 (2006):1001–1101.
 13. Jacxsens L., Kussaga J., Luning P. A., Van der Spiegel M., Devlieghere F., Uyttendaele M. (2009). A Microbial Assessment Scheme to measure microbial performance of Food Safety Management Systems. *Int. J. Food Microbiol.*; 134 (1-2):113-25.
 14. Mann J. E., Smith L., Brashears M. M. (2004). Validation of time and temperature values as critical limits for *Salmonella* and background flora growth during the production of fresh ground and boneless pork products. *J Food Prot.*; 67 (7): 1389-93.
 15. Evans J. A., Russell S. L., James C., Corry J. E. L. (2004). Microbial contamination of food refrigeration equipment, *Journal of Food Engineering*; 62: 225–232.
 16. Codex Alimentarius Commission (2003). Recommended International code of practice general principles of food hygiene, *CAC/RCP1-1969*.