

# CONTAMINAZIONE DA MICRORGANISMI INDICATORI E PATOGENI PRESENTI SULLA CUTE DI BOVINI PRESENTATI AL MACELLO E NELLE CARCASSE DA ESSI DERIVATE

## ***INDICATOR AND PATHOGENIC MICROORGANISMS CONTAMINATION OF HIDE OF CATTLE PRESENTED TO FOR SLAUGHTER AND CONTAMINATION OF THE RESULTANT CARCASSES***

Liuzzo G.<sup>1</sup>, Riu R.<sup>2</sup>, Merialdi G.<sup>3</sup>, Bardasi L.<sup>3</sup>, Galletti G.<sup>3</sup>, Carra E.<sup>3</sup>, Rosmini R.<sup>2</sup>, Giacometti F.<sup>2</sup>, Pizzamiglio V.<sup>2</sup>, Serraino A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>A.U.S.L. di Modena Distretto di Carpi; <sup>2</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna; <sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

### **SUMMARY**

Foodborne pathogens including *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp.* and *Campylobacter spp.*, can enter the meat chain at multiple points. Animals with excessively dirty hides will represent a risk of cross-contaminations during transport, in the slaughtered house environment and during dressing procedures. The aim of this work was to investigate the relationship among hygiene indicator microorganisms (*Enterobacteriaceae* and *Escherichia coli*) count, in hide and carcass of cattle presented for slaughter, and different hide cleanliness level in two abattoir (R and F) and estimate the prevalence of pathogens *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp.* and *Campylobacter spp.* in hide and carcass of dirty animals. The results showed that hide *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* count were significantly higher in dirty animals than in clean animals ( $P < 0,05$ ), but carcass contamination were significantly higher in dirty animals than in clean animals only in R abattoir. *Escherichia coli* O 157:H7 was detected in 19 samples of hide (40,4%), and 2 samples of carcass. *Campylobacter jejuni* was isolated in 13 samples of hide (25,5%) and one sample of carcass. *Salmonella spp.* were not found in all the samples of hide and carcass.

### **KEYWORDS**

Foodborne pathogens, cleanliness of hide, cross-contamination

### **INTRODUZIONE**

La cute degli animali in generale e la cute ricoperta di escrementi in particolare, possono rappresentare una fonte di contaminazione della carcassa durante le attività di macellazione (1; 2). A seconda del sito anatomico considerato, la concentrazione dei microrganismi sulla superficie della cute varia tra  $10^4$  e  $10^9$  germi/cm<sup>2</sup> (3). In genere le contaminazioni più importanti si rilevano sulle superfici su cui poggia l'animale nelle fasi di riposo (ventre e punta del petto), considerando

che il suolo e la lettiera costituiscono le più probabili sorgenti di contaminazione della cute (3). La popolazione batterica che si ritrova sulla cute dei bovini può derivare dal suolo, dall'acqua, dalla vegetazione e dalle feci e vi possono essere rappresentate specie patogene per l'uomo quali *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* e *Listeria monocytogenes.*, (4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17). Le condizioni di allevamento, la stagione, le modalità di trasporto etc, possono influenzare il trasferimento di questi microrganismi dall'intestino alla cute degli

animali, e da questa, durante le attività di macellazione, alla carcassa. La positività della cute ai diversi microrganismi varia a seconda degli studi tra 0 e 80%, 15,4 e 100%, 37,7 e 75,5%, 13 e 25% rispettivamente per *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* termofili, con una variabilità dovuta sia al momento (allevamento, dopo il trasporto, alla stalla di sosta, dopo l'abbattimento, stagione) che al punto della cute in cui viene effettuato il campionamento (11; 12;18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25). I batteri possono essere trasferiti durante il processo di macellazione dalla cute alla carcassa per contatto diretto o indirettamente attraverso le mani degli operatori, i vestiti, gli utensili e i macchinari, (26; 27). Al fine di evitare l'introduzione di microrganismi patogeni nella filiera delle carni, risulta dunque importante assicurare che gli animali vengano presentati alla macellazione in condizioni di pulizia adeguate (28). Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la correlazione esistente tra le cariche microbiche in *Enterobacteriaceae* ed *Escherichia coli* di cute e carcassa di soggetti classificati per il differente grado di pulizia e di valutare la presenza di alcuni microrganismi patogeni su cute e carcasse di soggetti classificati durante visita ispettiva *ante mortem* come sporchi.

## MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra settembre 2008 e febbraio 2009, presso due macelli di medie e piccole dimensioni dell'Emilia Romagna, sono stati selezionati n.50 soggetti (25 per ciascun macello), classificati durante la visita ispettiva *ante mortem* per il grado di pulizia della cute in 5 differenti categorie: da 1 asciutto e pulito a 5 molto sporco come descritto precedentemente (29). Su tutti i soggetti sono stati effettuati dei campionamenti su cute e carcassa attraverso l'ausilio di spugnette sterili preinumidite ("Sponge Bag" – PBI International). I punti di campionamento sulle carcasse sono stati selezionati prendendo in considerazione le indicazioni fornite dalla ISO 17604:2003: punta del petto, fianco, inguine e garretto; mentre per la cute, si è deciso di prendere in considerazione le aree in cui, generalmente, avvengono le maggiori manipolazioni da parte degli operatori durante le attività di scuoiamento: punta del petto, linea alba, coscia e inguine. Per ogni sito è stata campionata una superficie di 100 cm<sup>2</sup>, strofinando le spugnette nell'area individuata per 5 volte in senso orizzontale e 5 volte in senso verticale, prima da un lato e poi dall'altro. Durante le attività di campionamento, presso

entrambe le strutture (R ed F), sono stati rilevati i dati relativi alle caratteristiche strutturali, velocità della linea di macellazione, numero di capi macellati al giorno, numero e mansioni degli operatori, tipo di scuoiamento, utilizzo di sterilizzatori, utilizzo di acqua per la rimozione dello sporco visibile, presenza di sporco visibile sulle carcasse.

Su ciascun campione è stata effettuata la numerazione delle Enterobatteriacee (Violet Red Bile Agar – OXOID addizionato di Glucosio – Carlo Erba; incubazione a 30°C per 24 ore) e di *Escherichia coli* (Tryptone Bile BCIG agar - OXOID; incubazione a 44°C per 24 ore). I campioni provenienti dalle singole aree di cute sono stati analizzati singolarmente, mentre per i campioni di carcassa sono stati analizzati in pool.

In sede di analisi statistica, i dati riferiti alle singole categorie sono stati aggregati in due macro-categorie così definite: la macro-categoria A (soggetti puliti) corrispondente alle categorie 1 e 2 e la macro-categoria B (soggetti sporchi) corrispondente alle categorie 3, 4 e 5. I valori di sintesi sono stati calcolati sulle trasformate logaritmiche dei dati, considerando pari a 2 e 9 i conteggi con risultato <3 e <10 CFU/cm<sup>3</sup> ( $\log_{10}(2)=0,3$ ;  $\log_{10}(9)=0,95$ ). Per valutare le differenze osservate tra le due categorie considerate, è stato utilizzato il test della mediana applicato ai dati originari.

Da luglio 2009 a novembre 2009, presso il macello F, in 13 differenti giornate di lavorazione, sono stati classificati per il grado di pulizia della cute (sulla base delle 5 categorie precedentemente illustrate) tutti i capi avviati alla macellazione. Dal totale sono stati selezionati n. 47 soggetti da sottoporre a campionamento, classificati nelle categorie 3, 4 e 5 (sporchi). Il campionamento è stato effettuato attraverso l'ausilio di "Sponge" preinumidite, strofinando ampie aree di superficie cutanea e di carcassa, insistendo particolarmente nelle aree in cui risultava apprezzabile dello sporco visibile. Tutti i campioni sono stati sottoposti alla ricerca di *Salmonella spp.*, *Campylobacter* termofili e *Escherichia coli* O157:H7. Le analisi microbiologiche sono state eseguite utilizzando la metodica ISO 6579:2002/Cor 1:2004 per *Salmonella spp* e la ISO 10272-1:2006 per *Campylobacter spp*. La ricerca di *Escherichia coli* O157: H7 è stata effettuata in Real Time PCR sul brodo di arricchimento mTSB+novobiocina (Brodo Tryptone Soia modificato contenente novobiocina) (ISO 16654:2003). I ceppi di *Campylobacter spp*. isolati sono stati sottoposti a identificazione e

analisi genetica mediante Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) impiegando l'Enzima di Restrizione Sma I. La preparazione del DNA batterico è stata eseguita secondo protocolli standard (30); la restrizione secondo il protocollo proposto da Ribot et al. (31). È stato inoltre calcolato l'indice di diversità di Simpson secondo Hunter e Gaston (32), in base alla formula:  $D: 1 - 1/(N(N-1) \sum n_j (n_j-1))$ ; dove N: numero di individui della popolazione, n: numero di campioni per genotipo j.

## RISULTATI

Numerazione di *Enterobacteriaceae* e di *Escherichia coli* su cute e carcasse  
L'aggregazione dei dati in due macrocategorie, evidenzia differenze significative ( $P < 0,05$ ) tra le

cariche contaminanti da *Escherichia coli* ed *Enterobacteriaceae* sulla cute di animali classificati puliti (categoria A) e animali classificati sporchi (categoria B) (tabella 5). Al contrario la differenza di carica contaminante da *Escherichia coli* ed *Enterobacteriaceae* sulle carcasse dei campioni provenienti da animali classificati in categoria A e B è risultata significativa ( $P < 0,05$ ) solamente nel macello R nonostante, anche nel macello F, si osservi comunque una contaminazione media maggiore sia per la carica contaminante sia di *Escherichia coli* ed *Enterobacteriaceae* nelle carcasse degli animali classificati nella categoria B rispetto a quelli della categoria A (tabella 1 e tabella 2).

**Tabella 1.** Valori medi di *Enterobacteriaceae* ed *Escherichia coli* (media  $\pm$  Sd)  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> su campioni di cute, per macello e macrocategoria di pulizia.

Macello	Parametro	Macrocategorie			
		A		B	
		M	sd	m	sd
R	<i>Enterobacteriaceae</i>	1,81 <sup>a</sup>	1,21	3,73 <sup>b</sup>	1,42
	<i>Escherichia coli</i>	1,58 <sup>a</sup>	1,09	3,12 <sup>b</sup>	1,23
F	<i>Enterobacteriaceae</i>	2,07 <sup>a</sup>	0,83	2,84 <sup>b</sup>	1,01
	<i>Escherichia coli</i>	1,78 <sup>a</sup>	0,70	2,51 <sup>b</sup>	1,12

Lettere differenti in apice entro ogni riga denotano differenze significative.

**Tabella 2.** Valori medi di *Enterobacteriaceae* ed *Escherichia coli* (media  $\pm$  Sd)  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> su campioni di carcassa, per macello e macrocategoria di pulizia.

Macello	Parametro	Macrocategorie			
		A		B	
		M	sd	m	sd
R	<i>Enterobacteriaceae</i>	0,30 <sup>a</sup>	0,00	1,40 <sup>b</sup>	1,43
	<i>Escherichia coli</i>	0,30 <sup>a</sup>	0,00	1,04 <sup>b</sup>	0,96
F	<i>Enterobacteriaceae</i>	1,01 <sup>a</sup>	0,73	1,28 <sup>a</sup>	0,68
	<i>Escherichia coli</i>	0,61 <sup>a</sup>	0,50	0,80 <sup>a</sup>	0,54

Lettere differenti in apice entro ogni riga denotano differenze significative.

Confrontando i dati rilevati nei due macelli all'interno delle medesime categorie (A Vs A e B Vs B); si evidenzia come le cariche contaminanti di *Enterobacteriaceae* ed *Escherichia coli* rilevate sulla cute, siano significativamente differenti ( $P < 0,05$ ) tra il macello R e nel macello F, essendo più elevate per gli animali di categoria A (pulito) nel macello F e più elevate nella categoria B (sporco) nel macello R; così come mediamente, il macello F macella animali

visivamente puliti (categoria A) con contaminazione superiore rispetto al macello R e animali visivamente sporchi (categoria B) con contaminazione inferiore rispetto al macello R e viceversa (Tabella 3).

In relazione alle carcasse, confrontando i dati ottenuti nei due macelli relativamente alle cariche contaminanti di *Enterobacteriaceae* ed *Escherichia coli* all'interno delle medesime categorie (A Vs A e B Vs B); si evidenzia una

differenza significativa nella contaminazione delle carcasse provenienti dai due macelli nei campioni provenienti da animali classificati puliti (categoria A) essendo quelle del macello F significativamente più elevate di quelle del

macello R ( $P < 0,05$ ) nella categoria sporco (B) invece, pure evidenziandosi una maggiore contaminazione delle carcasse del macello F, la differenza non risulta significativa (Tabella 4).

**Tabella 3.** Valori medi *Enterobacteriaceae* ed *Escherichia coli* log<sub>10</sub> CFU cm<sup>2</sup> della cute nel macello R e nel macello F.

Macrocategorie	Parametro	Macello	
		F	R
A	<i>Enterobacteriaceae</i>	2,07 <sup>a</sup>	1,81 <sup>b</sup>
	<i>Escherichia coli</i>	1,78 <sup>a</sup>	1,58 <sup>b</sup>
B	<i>Enterobacteriaceae</i>	2,84 <sup>a</sup>	3,73 <sup>b</sup>
	<i>Escherichia coli</i>	2,51 <sup>a</sup>	3,12 <sup>b</sup>

**Tabella 4.** Valori medi *Enterobacteriaceae* ed *Escherichia coli* log<sub>10</sub> CFU cm<sup>2</sup> della carcassa nel macello R e nel macello F.

Macrocategorie	Parametro	Macello	
		F	R
A	<i>Enterobacteriaceae</i>	1,01 <sup>a</sup>	0,30 <sup>b</sup>
	<i>Escherichia coli</i>	0,61 <sup>a</sup>	0,30 <sup>b</sup>
B	<i>Enterobacteriaceae</i>	1,28 <sup>a</sup>	1,40 <sup>a</sup>
	<i>Escherichia coli</i>	0,80 <sup>a</sup>	1,04 <sup>a</sup>

È utile evidenziare come, alla verifica dell'operatività effettuata in sede di campionamento, sia emerso che, nonostante il macello R presenti strutture più vecchie e usurate, nel macello F la presenza di una zona di incrocio tra zona sporca e zona pulita, la velocità della macellazione, il numero di capi macellati/gg, il turn over degli operatori e le pratiche di lavaggio di carcasse e pavimenti durante la macellazione, sono fattori di criticità in relazione all'igiene di macellazione; inoltre, nel macello F durante le giornate di campionamento è stato possibile riscontrare spesso la presenza di sporco visibile sulle carcasse, al contrario di quanto avviene nel macello R dove la presenza di sporco visibile è stata rara e circoscritta a zone limitate della carcassa.

Ricerca di microrganismi patogeni

I 47 animali campionati provenivano da 24 allevamenti; 11 allevamenti hanno portato al macello più di un capo che si presentava sporco (categoria 3, 4 o 5) da un minimo di 2 capi a un massimo di 5 capi; 14 allevamenti hanno portato 1 solo capo che si presentava sporco.

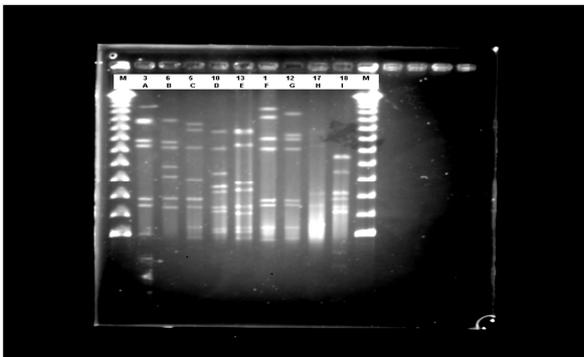
Su 47 campioni di cute e 47 campioni di

carcassa esaminati non è mai stata isolata *Salmonella* spp.; mentre *Escherichia coli* O157:H7 è stato rilevato con la PCR in 19 campioni di cute (40,4%) e 2 campioni di carcassa, ma non è stato possibile isolare *Escherichia coli* O157:H7 da nessuno dei campioni; i due animali che hanno evidenziato positività della carcassa presentavano contemporaneamente positività per il patogeno anche sulla cute; 12 di 19 positività riscontrate nella cute degli animali sono state rilevate in 6 allevamenti che hanno portato al macello più di un animale; in questi allevamenti su 18 animali campionati in totale, 12 hanno evidenziato positività per *Escherichia coli* O157:H7; gli altri 7 campioni positivi provenivano da animali che provenivano da allevamenti che hanno portato al macello un solo animale sporco.

*Campylobacter* spp. è stato isolato in 13 campioni di cute (25,5%) e 1 campione di carcassa; tutti i ceppi isolati sono stati identificati come *Campylobacter jejuni*. In nessun animale è stato possibile isolare contemporaneamente *Campylobacter jejuni* dalla cute e dalla carcassa; la caratterizzazione mediante PFGE ha evidenziato 9 profili PFGE

(Figura 1) identificati con le lettere A - I; il pulsotipo H, isolato dalla carcassa, è stato isolato in una sola occasione. Degli altri pulsotipi, il pulsotipo A è stato isolato 4 volte; 2 ceppi sono stati isolati da 2 bovini provenienti dalla stessa azienda (azienda  $\alpha$ ) in 2 giornate di macellazione differenti e 2 ceppi sono stati isolati da bovini provenienti da 2 aziende ( $\beta$  e  $\pi$ ) differenti; entrambi questi ultimi capi sono stati macellati in giornate in cui sono stati macellati i primi due capi provenienti dalla azienda  $\alpha$ . Il pulsotipo C è stato isolato 2 volte da bovini provenienti dall'azienda A in due differenti giornate di macellazione. Gli altri pulsotipi (B, D, E, F, G e I) sono stati isolati una sola volta, in bovini provenienti da aziende differenti.

**Figura 1.** Profilo PFGE di 13 ceppi di *Campylobacter jejuni* isolati.



L'indice di diversità di Simpson per i 13 ceppi di *Campylobacter jejuni* genotipizzati è risultato pari a 0,910.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I dati aggregati delle macrocategorie A e B dimostrano che, in entrambi i macelli, esiste una correlazione tra stato di pulizia degli animali e cariche di *Enterobacteriaceae* ed *Escherichia coli* sulla cute; mentre soltanto nel macello R è stato possibile dimostrare una correlazione tra stato di sporcizia visibile degli animali e cariche di *Enterobacteriaceae* ed *Escherichia coli* della carcassa. Il confronto dei dati sul livello di contaminazione della cute dei soggetti provenienti da entrambi i macelli all'interno delle due macro categorie (A e B) ha evidenziato che la cute degli animali puliti (cat A) del macello F presenta mediamente una contaminazione superiore a quella del macello R e che, al contrario la cute degli animali sporchi (cat B) presenta mediamente una contaminazione superiore nel macello R piuttosto che nel macello F (Tabella 3). Questo fatto, unitamente al fatto che nel macello F sono state rilevate criticità nelle pratiche di macellazione che determinano spesso la

presenza di imbrattamento visibile delle carcasse, può giustificare un livellamento delle contaminazioni delle carcasse provenienti da animali giudicati, alla visita *ante mortem*, in differenti categorie (A vs B) di pulizia, rendendo la differenza della contaminazione non significativa.

Per quanto riguarda i microrganismi patogeni, la percentuale di campioni di cute positivi per *Escherichia coli* O157:H7 e per *Campylobacter spp.* sono risultati paragonabili a quelle di altri autori, mentre è differente il risultato ottenuto per *Salmonella spp.*, per la quale non è stato possibile evidenziare alcun campione positivo. I dati evidenziano che la maggior parte delle positività della cute per *Escherichia coli* O157:H7 (12 campioni su 19), sono attribuibili a un numero ristretto di allevamenti (6 di 24) e che, nei due casi nei quali è stata evidenziata la positività della carcassa, è stata evidenziata anche la positività della cute. Avery et al. (33) hanno isolato *Escherichia coli* O157:H7 con pattern PFGE identici da carcasse, ambiente (stalla di sosta) e cute, evidenziando l'importanza della cross-contamination, mentre Fegan et al. (8) e Elder et al. (1) suggeriscono una relazione tra il numero di *Escherichia coli* presenti sulla pelle e contaminazione della carcassa. Il mancato isolamento di ceppi nella nostra indagine non permette ulteriori approfondimenti epidemiologici.

L'isolamento dalla cute di animali provenienti dallo stesso allevamento di ceppi di *Campylobacter jejuni* con medesimo pulsotipo (pulsotipo A e C nell'azienda  $\alpha$ ), in giornate di macellazione differenti, evidenzia l'importanza dell'allevamento e, di conseguenza, della contaminazione della cute degli animali, in relazione all'ingresso di microrganismi patogeni nei locali di macellazione. L'isolamento dello stesso pulsotipo A da bovini provenienti da aziende diverse ( $\beta$  e  $\pi$ ) in 2 giornate di macellazione in cui sono stati macellati bovini provenienti dalle aziende  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\alpha$  e  $\pi$  può avere tre spiegazioni: i) una correlazione che determina la presenza del medesimo ceppo nei bovini delle due aziende (ma non disponiamo di dati sufficienti per dimostrare questo); ii) una cross contaminazione degli animali nelle fasi che precedono la macellazione (stalla di sosta del macello); iii) una cross contaminazione durante le operazioni di macellazione.

Le conclusioni, a nostro avviso, giustificano l'adozione di un sistema validato di valutazione dello stato di pulizia degli animali avviati al macello e l'applicazione, nel caso di animali non adeguatamente puliti, di azioni volte prevenire la macellazione di animali a rischio (categorie 3,

4 e 5) quali il respingimento degli animali, la loro pulizia premacellazione o l'adozione di pratiche volte a ridurre la contaminazione delle carcasse da essi derivate, così come proposto da differenti autori (27; 34; 35; 36).

## BIBLIOGRAFIA

1. Elder R.O., Keen J.E., Siragusa, G.R., Barkocy-Gallagher G.A., Koohmaraie M., Laegreid W.W. (2000). Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing, in *Proceedings of the National Academies of Sciences*, 97, 2999-3003.
2. Reid, C.A., Small A., Avery S.M., Buncic S. (2002). Presence of food-borne pathogens on cattle hides. *Food Control*, 13, 411-415.
3. Cartier P. (1994). Utilisation de l'état de propreté des gros bovins comme indicateur de la charge microbienne de leur cuir, in *Viandes et produits carnés*, 15(4), 119-122 (1 ref.).
4. McEvoy, J. M., Doherty A. M., Finnerty M., Sheridan J. J., McGuire L., Blair I. S., MacDowell D. A., Harrington D. (2000). The relationship between hide cleanliness and bacterial numbers on beef carcasses at a commercial abattoir. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 390-395.
5. Bacon R.T., Belk K. E., Sofos J.N., Clayton R.P., Reagan J.O., Smith G.C. (2000). Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plant employing multiple-sequential intervention for decontamination, in *Journal of Food Protection*, 63, 1080-1086.
6. Elder R.O., Keen J.E., Siragusa, G.R., Barkocy-Gallagher G.A., Koohmaraie M., Laegreid W.W. (2000). Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing, in *Proceedings of the National Academies of Sciences*, 97, 2999-3003.
7. Rivera-Betancourt M., Shackelford S., Arthur T., Westermoreland K., Bellinger G., Rossman M., Reagan J., Koohmaraie M. (2004). Prevalence of *Escherichia coli* O157:h7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. *Journal of Food Protection*, 67, 295-302.
8. Fegan N., Higgs G., Vanderlinde P., Desmarchelier P. (2005). An investigation of *Escherichia coli* O157 contamination of cattle during slaughter at an abattoir. *Journal of Food Protection*, 68, 3: 451-457.
9. Arthur T., Bosilevac J., Brichta-Harhay M., Guerini M, Kalchayanand N., Shackelford S., Wheeler T., Koohmaraie M. (2007). Transportation and lairage environment effects on prevalence, number, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 on hide and carcasses of beef cattle at processing. *Journal of Food Protection*, 70, 280-286.
10. Nastaijevic I., Mitrovic R., Buncic S. (2008). Occurrence of *Escherichia coli* O157 on hides of slaughtered cattle. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 126-131.
11. Renter D.G., Sargeant J.M. (2002). Eterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 epidemiology and ecology in bovine production environments. *CAB international – Animal Health Research Reviews*, 3(2), 83-94.
12. Arthur, T.M., Kalchayanand, N., Bosilevac, J.M., Brichta-Harhay, D.M., Shackelford, S.D., Bono, J.L., Wheeler, T.L., and Koohmaraie, M. (2008). Comparison of Effects of Antimicrobial Interventions on Multidrug-Resistant *Salmonella*, Susceptible *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 71, 2177-2181.
13. Dewell G.A., Simpson C.A., Dewell R.D., Hyatt D.R., Belk K.E., Scanga J.A., Morley P.S., Grandin T., Smith G.C., Dargatz D.A., Wagner B.A., Salman M.D. (2008). Impact of Trasportation and Lairage on Hide Contamination with *Escherichia coli* O157 in finished beef cattle. *Journal of Food Protection*, 71, 1114-1118.
14. Boqvist S., Aspan A., Eriksson E. (2009). Prevalence of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in fecal and ear samples from slaughtered cattle in Sweden. *Journal of Food Protection*, 72(8), 1709-1712.
15. Arthur T.M., Keen J.E., Bosilevac J.M., Brichta-Harhay D.M., Kalchayanand N., Shackelford S.D., Wheeler T.L., Nou X., Koohmaraie M. (2009). Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 in a beef cattle feddlot and role of high-level shedders in hide contamination. *Applied and Environmental microbiology*, 75, 6515-6523
16. Bosilevac J.M., Arthur T.M., Bono J.L., Brichta-Harhay D.M., Kalchayanand N., King D.A., Shackelford S.D., Wheeler T.L., Tommy L., Koohmaraie M. (2009). Prevalence and enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in U.S: abattoirs that process fewer than 1000 head

- of cattle per day. *Journal of food protection*, 72(6), 1272-1278.
17. Fegan N., Higgs G., Duffy L.L., Barlow R.S. (2009). The effects of transport and Lairage on counts of *Escherichia coli* O157 in the feces and on the hides of individual cattle. *Foodborne pathogens and disease*, 6(9), 113-1120.
  18. Bacon R.T., Sofos J.N., Belk K.E., Hyatt D.R., Smith G.C. (2002). Prevalence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* isolated from beef animal hides and carcasses. *Journal of food protection*, 65(2), 284-290.
  19. Rivera-Betancourt M., Shackelford S., Arthur T., Westmoreland K., Bellinger G., Rossman M., Reagan J., Koohmaraire M. (2004). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. *Journal of Food Protection*, 67, 295-302.
  20. Guerini M.N., Harhay D.M., Shackelford S.D., Arthur T.M., Bosilevac J.M., Kalchayanand N., Wheeler T.L., Koohmaraie, M. (2007). *Listeria* prevalence and *Listeria monocytogenes* serovar diversity at cull cow and bull processing plants in the United States. *Journal of Food Protection*, 70(11), 2578-2582.
  21. Davies, M. H., Hadley P. J., Stosic P. J., and Webster S. D. (2000). Production factors that influence the hygienic condition of finished beef cattle. *The Veterinary Record*, 146, 179-183.
  22. Nastajjevic I., Mitrovic R., Buncic S. (2008). Occurrence of *Escherichia coli* O157 on hides of slaughtered cattle. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 126-131.
  23. Dewell G.A., Simpson C.A., Dewell R.D., Hyatt D.R., Belk K.E., Scanga J.A., Morley P.S., Grandin T., Smith G.C., Dargatz D.A., Wagner B.A., Salman M.D. (2008), Impact of Trasportation and Lairage on Hide Contamination with *Escherichia coli* O157 in finished beef cattle. *Journal of Food Protection*, 71, 1114-1118.
  24. Laval A., Fournaud F., Cartier P. (1997). Salmonellose et filière viande bovine. Séminaire Salmonelloses et Ruminants. Paris.
  25. Collis V. J., Davies M. H., Hutchison M. L., Buncic S., Reid C. A. Synge B. A. Lyne A. R. (2003), Source and spread of particulate and bacterial contamination between cattle during the farm to abattoir phase of production. *Food Standard Agency, Project M01009 – Final Report*.
  26. Bell, R. G. (1997), Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses, in *Journal of Applied Microbiology*, 82, 292-300.
  27. McEvoy, J. M., Doherty A. M., Sheridan J. J., McGuire L. (2000). Contamination of beef carcasses during hide removal and use of a test bacterial decontamination system on beef hide. *Agriculture and Food Development Authority. The National Food Centre. Final Report N. 4577*.
  28. Bolton D.J., Byrne C.M., Sheridan J.J., McDowell D.A., Blair I.S. (1999). The survival characteristics of a non-toxigenic strain of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 407-411.
  29. Riu R., Liuzzo G., Merialdi G., Bardasi L., Galletti G., Coccollone A., Giacometti F., Serraino A., Rosmini R. (2009). Correlazione tra carica microbica della cute di bovini presentati al macello e caratteristiche microbiologiche delle carcasse da essi derivate. *Rivista dell'Associazione Italiana dei Veterinari Igienisti (A.I.V.I)*, 6, 37-42.
  30. Gautom R K. (1997). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 2977-80.
  31. Ribot, E. M., C. Fitzgerald, K. Kubota, B. Swaminathan, Barrett T.J. (2001). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 1889-1894.
  32. Hunter P.R. and Gaston M.A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 2465-2466.
  33. Avery S.M., Liebana E., Hutchison M.L., Buncic S. (2004). Pulsed field gel electrophoresis of related *Escherichia coli* O157 isolates associated with beef cattle and comparison with unrelated isolated from animals, meats and humans. *Journal of Food Microbiology*, 92, 161-169.
  34. Byrne C.M, Bolton D.J., Sheridan J.J., McDowell D.A., Blair S. (2000). The effects of preslaughter washing on the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 transfer from cattle hides to carcasses during slaughter, in *Letters in Applied Microbiology*, 30:142-145.
  35. Small A., Wells-Burr B., Buncic S., (2005). An evaluation of selected methods for the

- decontamination of cattle hides prior to skinning. *Meat Science*. 69, 263-268.
36. Carlson B.A., Geornaras I., Yoon Y., Scanga J.A., Sofos J., Smith G.C., Belk K.E. (2008).

Studies to evaluated chemicals and conditions with low-pressure application for reducing microbial caunts on cattle hides. *Journal of Food Protection*, 71, 1343-1348.