

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Dipartimento di Medicina Animale, Produzione e Salute

Corso di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari

VALUTAZIONE MICROBIOLOGICA DI
FRATTAGLIE REGOLARMENTE
COMMERCIALIZZATE

Relatore: Prof. Paolo Catellani

Laureanda: Elena Sartori

Matricola: 1128598

ANNO ACCADEMICO 2016-2017

A Stella Giovannini e ad Alberto Scandolara

Indice

Riassunto

Abstract

1. Scopo della tesi	1
2. Introduzione	2
3. Frattaglie	3
3.1. Fegato	7
3.2. Cuore	10
3.3. Lingua.....	11
3.4. Prestomaci e stomaci	11
3.5. Rete o omento	12
3.6. Reni o rognoni	12
3.7. Cervello	13
3.8. Polmone.....	13
3.9. Nervetti.....	14
3.10. Colli di tacchino.....	14
4. Caratteristiche microbiologiche e pericoli	16
4.1. Pseudomonas spp.....	16
4.2. Aeromonas spp.	17
4.3. Enterobacteriaceae.....	17
4.4. Coliformi fecali.....	17
4.5. Batteri lattici	17
4.6. Staphylococcus spp. e Staphylococcus aureus	18
4.7. Campylobacter.....	19
4.8. Yersinia enterocolitica.....	19
4.9. Salmonella	20
4.10. Listeria monocytogenes.....	20
5. Possibili fonti di contaminazione microbica delle frattaglie.....	21
5.1. Macello	21
5.2. Trasporto.....	21
5.3. Punti vendita.....	22

6. Materiali e metodi	23
6.1. Materiali.....	23
6.2. Metodi.....	24
7. Risultati e discussione.....	38
8. Considerazioni	53
9. Conclusioni	61
10. Bibliografia	63

Riassunto

Le frattaglie, in particolare di bovino, suino, pollo e tacchino, negli ultimi anni sono state riscoperte dal consumatore, dopo che i consumi, a causa dello scandalo della BSE negli anni 90', erano crollati. Tali prodotti un tempo erano considerati come fonte proteica per le classi povere o come degli scarti, ma sono tornati in auge grazie all'odierna valorizzazione delle materie prime "povere". Il lavoro svolto in questa tesi ha consentito di ottenere una valutazione generale del livello di contaminazione delle frattaglie regolarmente commercializzate e acquistate presso tre punti vendita della grande distribuzione in provincia di Verona, tra giugno e luglio 2017, per un totale di 57 campioni. È emerso che il 38,6% dei campioni analizzati presenta una Conta Microbica Totale superiore a 10^8 log UFC/g e il 15,8% una carica da Enterobacteriaceae superiore a 10^6 log UFC/g, soglie oltre cui i prodotti non sono considerati accettabili secondo le linee guida della Direzione Sanità della Regione Piemonte del 2011. Per le cariche riscontrate, sarebbe necessario tener più sotto controllo, dal punto di vista igienico, la lavorazione sia a livello del macello (lavaggio, pulizia, asciugatura) sia del punto vendita (toielettatura, taglio, confezionamento), dato che 52 campioni su 57 sono preincartati, puntando anche su un corretto mantenimento della catena del freddo. Il numero di campioni analizzati non è elevato e le tipologie di matrice sono vari, ma consentono, comunque, di avere un'idea della carica delle frattaglie in commercio.

Abstract

In the last few years, the consumer has shown more interest in offal, especially offal of bovine, pig, chicken and turkey, though he was afraid of it during the nineties, because of the BSE. In the past, these products were considered such as a source of protein for the lower class or such as wastes. They have become popular thanks to the rediscovery of the potential of "poor" raw materials. The purpose of this thesis is a general microbiological evaluation of regularly marketed offal, bought in three different GD supermarkets near Verona, during the period June-July 2017: 57 samples were collected. The results show that the 38,6% of the analyzed samples has an Aerobic Plate Count (APC) higher than 10^8 log CFU/g and that the 15,8% has Enterobacteriaceae higher than 10^6 log CFU/g: over these values, the products are not considered acceptable yet, according to the guidelines of Direzione Sanità Regione Piemonte of 2011. Due to the microbial load obtained, it would be better if the food operators kept the hygienic condition under control at the slaughterhouse (washing, cleaning, and drying) and at the supermarket (grooming, cutting, packaging), as 52 of 57 samples were wrapped at the

supermarket. They should also properly maintain the cold chain. The number of the samples analyzed is not very large and many different kinds of items were considered, but, anyway, we could have an idea of the microbial load of regularly marketed offal.

1. Scopo della tesi

Tale elaborazione ha l'obiettivo di constatare il livello e il tipo di contaminazione di frattaglie regolarmente commercializzate, in termini di analisi quantitative e qualitative, relative ai principali patogeni e alternati tipici dei prodotti di origine animale. Il lavoro è stato approntato come analisi conoscitiva delle tipologie di frattaglie proposte nei punti vendita della Grande Distribuzione e del loro livello di contaminazione.

2. Introduzione

Le frattaglie sono prodotti alimentari che, a partire dagli anni '90, hanno visto un totale crollo dei consumi a causa della problematica della BSE, altrimenti nota come “Mucca pazza”, il cui timore ha allontanato i consumatori anche dalle frattaglie non incriminate. Da qualche anno, tali prodotti hanno ricominciato ad essere consumati, non solo come alternativa economica alla carne come fonte proteica, com'era un tempo, o come avviene ancora oggi nei paesi poveri, ma soprattutto nell'alta cucina, dove la riscoperta delle materie prime “povere” è ormai moda diffusa.

Questo rinnovato interesse spinge la ricerca non solo in campo microbiologico, ma anche economico, a soffermarsi su tali prodotti, motivo per cui nasce anche questo lavoro di valutazione microbiologica. Non esistono molte ricerche recenti relative all'argomento, né la legislazione vigente si sofferma specificamente sulle frattaglie; esistono delle linee guida a cui fare riferimento, ma non per tutti i microrganismi, sia alteranti che patogeni. Dopo una descrizione delle frattaglie, dei contaminanti microbiologici che vi si possono riscontrare e dei punti della filiera in cui può avvenire la contaminazione, ci si concentra sulla parte sperimentale eseguita in laboratorio e sul confronto di quanto ottenuto con i dati evinti dalla bibliografia. L'elaborato è stato concepito per ottenere nuovi dati sulla contaminazione di frattaglie regolarmente commercializzate presso la Grande Distribuzione, confrontandoli con quelli già presenti per avere un quadro generale del livello di carica batterica dei prodotti che si acquistano.

3. Frattaglie

Il Regolamento (CE) 853/2004, nell'allegato relativo alle definizioni, chiarisce il termine "frattaglie" come *le carni fresche diverse da quelle della carcassa, inclusi i visceri e il sangue*, e definisce "visceri" *gli organi della cavità toracica, addominale e pelvica, nonché la trachea e l'esofago, e il gozzo degli uccelli*. Il recupero di queste parti, spesso non è giustificato da un elevato valore economico delle materie prime, ma più che altro viene effettuato per risparmiare sui costi di smaltimento. I visceri appartengono al quinto quarto alimentare, che comprende: visceri (cuore, fegato, cervello, polmoni, pancreas, lingua, milza, timo, midollo spinale), parte del tubo gastroenterico (per le trippe), reni (quando staccati dalla carcassa), testa, mammelle, testicoli, zampi e sangue se viene raccolto (nella quasi totalità dei casi viene impiegato dalle industrie di trasformazione e non viene direttamente commercializzato) (Scanzani *et al.* 2008). Esistono vari tipi di classificazione per le frattaglie basate su determinati parametri:

- Edibili/non edibili. Tale distinzione dipende, anzitutto, dalla legislazione vigente, dalla tradizione e dalle condizioni socioeconomiche della popolazione (Nollet e Toldrà 2011; Catellani 2017): per le fasce più agiate possono risultare come sottoprodotti di scarto, per quelle meno agiate, questi prodotti possono costituire un'importante fonte proteica a basso costo. La tradizione gioca un ruolo fondamentale nell'attribuire un valore aggiunto ad alcune tipologie di frattaglie, in particolare per trippe e lingua, ma anche fegato. Per quanto concerne la legislazione, al fine di tenere sotto controllo la problematica della BSE, e in generale delle encefalopatie spongiformi, è proibita la commercializzazione e il consumo di "Materiale Specifico a Rischio", come definito dal Regolamento (CE) 999/2001 (modificato dal Regolamento (CE) 722/2207 e dal Regolamento (CE) 357/2008): *"È necessario che il materiale specifico a rischio sia rimosso ed eliminato in modo da evitare qualsiasi rischio per la salute umana o animale. In particolare, occorre che esso non sia immesso sul mercato quale alimento destinato al consumo umano, mangime o fertilizzante"*. Sono compresi, per quanto riguarda i bovini, il cranio, esclusa la mandibola e compreso il cervello, gli occhi e il midollo spinale di animali con più di 12 mesi d'età, la colonna vertebrale (eccetto le vertebre caudali) le apofisi spinose e i processi trasversi delle vertebre cervicali, toraciche e lombari e la cresta sacrale mediana e le ali del sacro, ma inclusi i gangli della radice dorsale dei bovini di età superiore a 30 mesi, le tonsille, l'intestino dal duodeno al retto al mesentere, per tutti i bovini; per gli ovi-caprini sono compresi cranio, occhi, cervello, tonsille e midollo spinale per animali con più di 12 mesi d'età o ai quali è

spuntato un incisivo permanente, milza ed ileo per gli animali di tutte le età (Scanzani *et al.* 2008). Tra le frattaglie non edibili, vanno citate anche quelle non utilizzabili per produrre prodotti a base di carne, come dichiarato nella Sezione VI dell'Allegato 3 del Regolamento (CE) 853/2004:

- organi dell'apparato genitale maschile e femminile, esclusi i testicoli;
 - organi dell'apparato urinario, esclusi reni e vescica;
 - cartilagine della laringe, della trachea, dei bronchi extralobulari; occhi e palpebre; condotto auditivo esterno; tessuti cornei;
 - testa dei volatili (eccetto cresta, orecchie, bargigli e caruncola), esofago, gozzo, intestini e organi dell'apparato genitale (Catellani 2017).
- Rosse, bianche, verdi. Questa distinzione, non ufficiale e non accettata completamente da tutti, come sostiene Catellani (2017), si basa sull'aspetto e sul colore dei prodotti: tra le frattaglie rosse si annoverano cuore, lingua, fegato, reni, polmoni, milza e sangue; tra quelle bianche troviamo midollo spinale, cervella, animelle, testicoli e mammella; le frattaglie verdi derivano dal tratto digerente e a contatto con fieno o mangime: tra queste si considerano esofago, prestomaci e stomaco, intestini e gozzo per gli uccelli. Spesso gli zampini sono considerati come quasi o pseudo-frattaglie, perché non situati all'interno dell'animale; tra queste troviamo anche testa, guance, orecchie e coda.

In antichità (dai Sumeri ai Romani) erano considerate come cibo divinatorio e molti popoli, tra cui si ricordano in particolare gli Etruschi, praticavano l'aruspicina, arte divinatoria consistente nell'esaminare le viscere (e in particolare fegato ed intestino) degli animali sacrificati durante le cerimonie religiose, confrontando segni, forme o anomalie riscontrate con un modello di fegato bronzeo, mostrato in Figura 1, per trarne così dei segni divini o di condotta da tenere.



Figura 1. Fegato di Piacenza (www.piacenzantica.it)

Oltre ad un significato prettamente religioso, le frattaglie erano molto apprezzate dal punto di vista culinario e mantennero questa fortuna per tutto il Medioevo ed il Rinascimento; a partire dal Settecento hanno iniziato ad assumere la fama di cibo destinato alle classi meno abbienti,

vedendo poi, nell'Ottocento, una distinzione tra frattaglie di prima categoria, comprendente fegati e animelle, per le classi ricche, e di seconda categoria, con trippe, budella e zampini per le povere. Un crollo completo dei consumi è arrivato a partire dagli anni '90 del 1900 a causa della problematica della BSE ("Mucca pazza"): da lì sono stati definiti i "Materiali specifici a rischio" di cui sono vietati consumo e commercializzazione, ma è diminuito drasticamente anche il consumo delle frattaglie non pericolose, della carne di bovino in generale e anche di altre specie. Dopo più di vent'anni è stata riabilitata l'immagine di molte frattaglie, grazie anche alla moda del recupero degli ingredienti poveri reinventati come piatti raffinati e costosi. Il mercato infatti, ha visto, negli ultimi anni una lenta ripresa (Schira 2008).

Le frattaglie sono ottenute, in fase di macellazione tramite l'operazione unitaria dell'eviscerazione, che differisce leggermente da specie a specie. Viene qui considerata l'eviscerazione di bovini, suini e avicoli. La frazione di sottoprodotti edibili dipende da specie, sesso, età, peso vivo e varia dal 10 al 30% per bovini, suini e ovi caprini e dal 5 al 6% per gli avicoli, come si evince dalla Tabella 1 (Nollet e Toldrà 2011).

Tabella 1. Quantità di *by-products* (Nollet e Toldrà 2011)

	By-Product: Percentage of Live Weight			
	Beef	Hog or Pig	Lamb	Chicken
Blood	2.4–6	2–6	4–9	1.4–2.3 kg
Brain	0.08–0.12	0.08–0.1	0.26	0.2–0.3
Chitterlings	0.06			
Ears	0.02			
Feet	1.9–2.1	1.5–2.2	2.0	
Gizzard				1.9–2.3
Gullet	0.03	0.1		
Head		5.2	6.7	
Heart	0.3–0.5	0.15–0.35	0.3–1.1	0.3–0.8
Intestines		1.8	3.3	
Kidney	0.07–0.24	0.2–0.4	0.3–0.6	
Liver	1.0–4.5	1.1–2.4	0.9–2.2	1.6–2.3
Lungs	0.4–0.8	0.4–0.85	0.7–2.2	0.7
Pancreas	0.06	0.1	0.2	
Penis	0.18			
Spleen	0.1–0.27	0.1–0.16	0.1–0.4	0.15
Tail	0.1–0.25	0.1		
Tongue	0.25–0.5	0.3–0.4		
Tripe	0.75	0.6–0.7	2.9–4.6	

Source: Ockerman, H.W. and Basu, L., By-products/edible, for human consumption, in: Devine, C., Dikeman, M., and Jensen, W.K. (Eds.), *Encyclopedia of Meat Sciences*, Academic Press, New York, 2004, pp. 104–112. With permission.

Per la macellazione di bovini e suini, si procede con stordimento, iugulazione, dissanguamento, scuoiatura ed eviscerazione. Eccetto i reni, tutti gli altri visceri devono essere asportati nel più breve tempo possibile per diminuire il rischio di contaminazione. Prima della vera e propria eviscerazione, si procede distaccandole mammelle nelle femmine e pene e testicoli nel maschio; in corrispondenza della linea alba si incide la parete addominale e il torace viene aperto tramite una sezione sagittale dello sterno (Scanzani *et al.* 2008). Per cercare di limitare contaminazione della carcassa e dei visceri con materiale contenuto nel canale digerente, che ha un'elevata concentrazione di batteri contaminanti e potenzialmente alcuni patogeni, l'esofago viene legato a livello del cardias in modo da appiattirne il lume, mentre l'apertura anale viene rivestita con un sacchetto in materiale plastico per arginare eventuali fuoriuscite (Ghinelli 1975, Scanzani *et al.* 2008, Catellani 2017). Si deve, quindi, porre la massima cura ed attenzione anche a non lacerare il tratto gastro intestinale durante le operazioni di macellazione. A partire dall'ano, l'intestino viene asportato procedendo prossimalmente tagliando la connessione del mesentere con la volta della parete addominale. Lo stomaco e i prestomaci, ove presenti, vengono tolti con l'intestino, tagliando l'esofago a livello del cardias. Nei ruminanti, la milza rimane adesa al diaframma, altrimenti viene asportata. Il diaframma, connesso al fegato, viene inciso a livello della sua inserzione e si procede, dunque, ad asportare la corata (cuore, polmone con trachea, esofago, aorta e timo) che viene appesa, tramite la trachea, ad un gancio ai fini della visita ispettiva *post-mortem*. La cistifellea viene subito tolta e si termina asportando utero, vagina e vescica (Scanzani *et al.* 2008). I reni rimangono adesi alla carcassa, ma devono essere privati della copertura di grasso e della capsula perirenale. Gli organi asportati sono sottoposti a lavaggio tramite forti getti di acqua in modo da togliere i residui di sangue di cui sono imbrattati. I visceri vengono, poi, allontanati dalla sala di macellazione e introdotti in attigui locali adibiti a tripperia e budelleria per un'ulteriore lavorazione. Le frattaglie, da questo momento per tutta la loro *shelf-life* devono essere conservate a 3°C; a tale temperatura la loro durata commerciale si attesta attorno a 3 giorni.

Nell'eviscerazione degli avicoli, si procede facendo entrare una lama circolare nella cloaca in modo da estroflettere i visceri dalla cavità toracica e addominale per un'immediata ispezione sanitaria. Questi devono restare adesi alla carcassa in modo da consentire la visita *post mortem* che deve essere effettuata nel più breve tempo possibile al fine di evitare l'aumento della contaminazione. Rimangono *in situ* reni e sacchi aeriferi. Vengono quindi asportati testa, trachea, esofago, zampe e i polmoni vengono aspirati (Ghinelli 1975, Scanzani *et al.* 2008).

Le frattaglie che maggiormente si trovano in commercio sono il fegato, la lingua bovina, il cuore, la coda, gli zampi, la cotenna di maiale e le trippe, ma si trovano anche centopelli (ottenuto dall'omero del bovino), reni, timo ("animella"), polmone e cervello di bovini di età inferiore a 12 mesi. I valori nutrizionali medi sono riportati in Tabella 2 e Tabella 3.

3.1.Fegato

È l'organo più ricercato dal punto di vista gastronomico, specie quello di vitello, mostrato in Figura 2. Quello di bovino adulto, vitello e suino pesano rispettivamente circa 5, 1,5 e 1,4 kg; quello di pollo è di circa 30-35 g. Presenta un elevato contenuto di vitamine B, B2, B6, B12, PP, D, A, acido pantotenico, acido folico, ferro, rame e zinco come mostrato in Tabella 2 e Tabella 3 e proteine ad elevato valore biologico. (Nollet e Toldrà 2011; Catellani 2017). Normalmente il colore varia dal rosso scarlatto al rosso scuro per tutti gli animali; quello di vitello tende quasi al color nocciola (Catellani 2017). In sede di macellazione, dopo che l'esame *post-mortem* ne ha determinato l'idoneità, viene marchiato a fuoco e vengono eliminate vene e arterie entranti e uscenti l'ilio epatico. Per il lavaggio si procede dapprima con una docciatura poi con un lavaggio più a fondo per aspersione con acqua potabile per circa 5 minuti. Dopo aver fatto scolare l'acqua in eccesso, la temperatura viene subito abbattuta e il prodotto confezionato, dato che, secondo il Regolamento (CE) 853/2004 le frattaglie devono essere portate e mantenute a 3°C. Presso il punto vendita sono eliminate le parti fibrose e il prodotto può essere presentato sia come pezzo intero, sia a fette sottili. (Catellani 2017)

Tabella 2. Caratteristiche nutrizionali di alcune frattaglie di bovino (Nollet e Toldrá 2011)

Components per 100 g of Beef Offal

	Protein (g)	Fat (g)	Ca (mg)	P (mg)	Fe (mg)	Na (mg)	K (mg)	Mg (mg)	Zn (mg)	Cu (mg)	Mn (mg)
Brain	10.4–11.5	8.6	10	312	2.1–2.4	125	219	13	1.22	0.20	0.04
Heart	14.9–28.5	3.6–20.0	5	195–230	4.0–4.9	86–95	193–320	23	2.38	0.36	0.04
Kidney	15.3–24.7	2.6–6.7	10–11	219–230	5.7–7.4	176–180	225–230	17	1.85	0.47	0.10
Liver	19.0–22.9	3.8–7.8	6–8	352–360	6.5–7.0	81–136	281–320	19	3.92	2.76	0.26
Pancreas	17.6–27.1	7.3	8	216–330	2.8–8.4	67	276	18	2.58	0.06	0.15
Tongue	15.3–22.2	10.4–14.6	6–8	170–182	2.1–2.9	73	197–250	16	2.47	0.17	0.03

	Thiamin (mg)	Riboflavin (mg)	Niacin (mg)	Vitamin B6 (mg)	Pantothenate (mg)	Biotin (µg)	Folacin (µg)	Vitamin B12 (µg)	Vitamin A (IU)	Ascorbic Acid (mg)	Cholesterol (mg)
Brain	0.07–0.23	0.22–0.26	3.0–4.7	0.10–0.26	2.5	2.0–6.1	4–12	7–4.7–10.9	Nihil	16.6–23.0	—
Heart	0.19–0.68	0.23–0.43	6.3–9.5	0.23–0.43	1.2–2.3	2.0–7.3	2–110	8.0–13.7	Traces-3.0	2.0–7.6	140
Kidney	0.28–0.38	0.32–0.44	5.4–7.9	0.32–0.44	3.4	24.0–92.0	41–77	8.5–31.0	264–880	8.9–15.0	285
Liver	0.23–0.28	0.74–0.94	12.8–21.0	0.74–0.94	5.5–8.3	33.0–100.0	81–330	65.0–110.0	12709–105032	2.6–31.0	354
Pancreas	0.14	0.20	3.1–5.8	0.20	3.8	14.0	—	4.8–5.0	Nihil	13.7–14.0	—
Tongue	0.12–0.17	0.13–0.31	3.9–4.9	0.13–0.31	2.0	1.0–3.3	4–7	3.8–7.0	Nihil	31–7.0	87

Sources: Ockerman, H.W. and Basu, L., By-products/edible, for human consumption, in: Devine, C., Dikeman, M., and Jensen, W.K. (Eds.), *Encyclopedia of Meat Sciences*, Academic Press, New York, 2004, pp. 104–112; Anderson, B.A., Composition and nutritional value of edible meat by-products, in: Pearson, A.M. and Dutson, T.R. (Eds.), *Edible Meat By-Products. Advances in Meat Research*, Elsevier Applied Science, London, U.K., 1988, vol. 5, pp. 15–45.

Tabella 3. Caratteristiche nutrizionali di alcune frattaglie di suino (Nollet e Toldrá 2011)

Components per 100g of Pork Offal

	Protein (g)	Fat (g)	Ca (mg)	P (mg)	Fe (mg)	Na (mg)	K (mg)	Mg (mg)	Zn (mg)	Cu (mg)	Mn (mg)
Brain	10.3–122	8.6–9.2	10	312	1.6–2.4	125	219	14	1.27	0.24	0.09
Heart	16.8–23.5	2.7–4.4	3–6	131–220	3.3–4.8	54–80	106–300	19	2.80	0.41	0.06
Kidney	15.4–25.4	2.7–3.6	8–11	218–270	5.0–6.7	115–190	178–290	17	2.75	0.62	0.12
Liver	18.9–21.6	2.4–6.8	6–10	356–370	19.2–21.0	73–87	271–320	18	5.76	0.68	0.34
Pancreas	28.5	4.0–15.0	—	—	18.9	—	—	17	2.62	0.09	0.16

	Thiamin (mg)	Riboflavin (mg)	Niacin (mg)	Vitamin B6 (mg)	Pantothenate (mg)	Biotin (µg)	Folacin (mg)	Vitamin B12 (µg)	Vitamin A (IU)	Ascorbic Acid (mg)	Cholesterol (mg)
Brain	0.16–0.23	0.26–0.28	4.3–4.4	0.19	2.8	—	6.0	2.2–2.8	Nihil	13.5–18.0	2195
Heart	0.13–0.16	0.81–1.24	6.6–9.6	0.29–0.39	2.5	4.0–18.0	2–4	2.4–8.0	Traces-106	3.0–5.3	131
Kidney	0.26–0.58	1.70–1.90	7.5–9.8	0.55	3.1	32.0–130	42	6.6–14.0	130–230	14.0–14.2	319
Liver	0.28–0.31	3.00	14.8–16.4	0.68–0.69	0.9	27.0	110–212	25.0–26.0	Nihil–10900	13.0–25.3	301
Pancreas	0.11	0.46	3.5	—	4.6	—	—	6.5–7.0	Nihil	15.0–15.3	—

Sources: Ockerman, H.W. and Basu, L., By-products/edible, for human consumption, in: Devine, C., Dikeman, M., and Jensen, W.K. (Eds.), *Encyclopedia of Meat Sciences*, Academic Press, New York, 2004, pp. 104–112; Anderson, B.A., Composition and nutritional value of edible meat by-products, in: Pearson, A.M. and Dutson, T.R. (Eds.), *Edible Meat By-Products. Advances in Meat Research*, Elsevier Applied Science, London, U.K., 1988, vol. 5, pp. 15–45.



Figura 2. Fegato di vitello a fette

3.2. Cuore

Il cuore di bovino adulto, vitello e suino, mostrato in Figura 3, pesa circa 1.4 kg, 227 g e 113 g. Dopo l'eviscerazione viene liberato dal sacco pericardico, dal grasso superficiale e dall'inserzione dei grossi vasi; è poi tagliato nei ventricoli e atri in modo da svuotarli dal sangue e dai coaguli, liberato dagli anelli fibrosi e dalle membrane degli ostii vasali ed atrio-ventricolari (Ghinelli 1975). È venduto, nella maggior parte dei casi, intero, ma lo si trova anche a fette. Richiede cotture prolungate e rimane un po' duro e tiglioso anche dopo il trattamento termico. Il suo valore nutritivo, in quanto muscolo, è paragonabile alla carne della carcassa (Catellani 2017).



Figura 3. Cuore di suino

3.3.Lingua

La colorazione del prodotto dipende dall'età e dall'alimentazione dell'animale: per bovino adulto e vitello è bianco-rosea con pigmentazioni nerastre in alcune razze, mentre per il suino è bianco-rosea. La superficie è ruvida a causa della presenza di molte papille. Dopo la dichiarazione di idoneità della carcassa, la lingua viene liberata dall'osso ioide e dalle ghiandole, lavata abbondantemente con acqua potabile e fatta asciugare (Catellani 2017). Dopo il *blanching*, si rimuove la membrana esterna; viene confezionata e raffreddata a temperatura inferiore a 4°C. La lingua di bovino adulto, vitello e suino pesa circa 2, 0,7 e 0,2 kg. Viene venduta intera al naturale, come in Figura 4. **Lingue di suino** ed è possibile reperire anche la lingua salmistrata (Nollet e Toldrà 2011).



Figura 4. Lingue di suino

3.4.Prestomaci e stomaci

Per i ruminanti, in commercio si trovano il centopelli, frattaglia ottenuta dalla lavorazione dell'omaso, e le trippe che derivano normalmente da rumine e reticolo. Tali visceri, mostrati in Figura 5, devono essere svuotati e puliti; le trippe devono essere sbiancate e pulite presso la sezione di tripperia e budelleria (Nollet e Toldrà 2011). I visceri vengono incisi e svuotati dal contenuto, lavati con acqua corrente e il grasso viene eliminato. Sia centopelli, che ha struttura lamellare e con molte pieghe, che trippa sono sottoposti a pulizia con acqua in macchina centrifuga pelatrice e sgrassatrice-raffinatrice a 50-70°C per 15-20 minuti, dove poi si aggiungono acqua e soda per lo sbiancamento (50-55°C per 15 minuti). Sono, quindi sciacquati in acqua fredda, fatti sgocciolare, demucosati e refrigerati. Possono essere tagliati a listarelle e venduti tal quali o dopo una ulteriore cottura (*shelf life* di 7 giorni) in vaschette di polistirene con film di polietilene o polipropilene. Per ottenere una *shelf life* fino a 30 giorni si applicano confezionamento sottovuoto e pastorizzazione, conservando il prodotto a 4°C (Catellani 2017). Il tessuto ha un aspetto sostenuto e gommoso e con un tipico colore chiaro.

Per gli avicoli viene consumato lo stomaco muscolare, detto ventriglio o durrello, a forma di sacco che va aperto, svuotato, privato della membrana interna e lavato (Scanzani *et al.* 2008).



Figura 5. Centopelli (sinistra); trippe (destra)

3.5.Rete o omento

Si tratta di una membrana bianca che ricopre lo stomaco del suino, come mostrato in Figura 6, impiegata per avvolgere gli alimenti prima della cottura, in modo da rilasciare il grasso e insaporire la pietanza durante la cottura (Schira 2008).



Figura 6. Rete di suino

3.6.Reni o rognoni

I reni, o rognoni, di bovino sono lobati, come mostrato in Figura 7 e pesano, rispettivamente, circa 500 g e 340 g, mentre quelli di maiale presentano un solo lobo e pesano 110 g (Nollet e Toldrà 2011). Per gli ungulati domestici, dopo l'eviscerazione, i reni devono restare nella loggia renale per l'esame *post-mortem*: il veterinario, dopo aver visionato e/o inciso i linfonodi renali, rimuoverà la capsula perirenale e il grasso ammesso. I reni vengono quindi sottoposti a

lavaggio, asciugatura e raffreddamento immediato, poiché il pH vicino alla neutralità favorisce lo sviluppo microbico (Catellani 2017).



Figura 7. Rete di bovino

3.7.Cervello

Il cervello dei bovini adulti appartiene al “Materiale Specifico a Rischio” in relazione alle encefalopatie bovine spongiformi. In commercio si può trovare il cervello di vitello, di colore bianco venato, molto molle e cedevole di consistenza perché molto ricco di lipidi, come mostrato in Figura 8. A causa dell’irrancidimento, che determina una colorazione giallo-grigiastro, la durabilità è molto limitata (Catellani 2017).



Figura 8. Cervella di vitello

3.8.Polmone

In Italia non è molto consumato ed è di più difficile reperibilità rispetto ad altre frattaglie; viene utilizzato maggiormente tra le popolazioni più povere del mondo. Il polmone di vitello, mostrato in Figura 9, è consumato in Argentina, Cile e Uruguay soprattutto (Nollet e Toldrá 2011).



Figura 9. Polmone di vitello

3.9. Nervetti

Si tratta della cartilagine del ginocchio e dello stinco del bovino. In commercio sono disponibili sia crudi che precotti, come mostrato in Figura 10. In particolare, quelli crudi richiedono una cottura molto prolungata (dalle 2 alle 4 ore) prima di ammorbidirsi.



Figura 10. Nervetti di bovino crudi (sinistra); precotti (destra)

3.10. Colli di tacchino

Utilizzati soprattutto per l'alimentazione degli animali da affezione, i colli, mostrati in Figura 11, sono anche impiegati in cucina; necessitano di lunga cottura in modo da poter staccare la carne presente dalle ossa prima di impiegarla in altre preparazioni. Sono considerate tra le frattaglie dall'articolo 3 del Regolamento (CE) 543/2008 che definisce le frattaglie edibili di avicoli che possono essere commercializzate separatamente dalla carcassa, tra cui si annoverano cuore, collo, ventriglio, fegato e tutte le altre parti considerate commestibili sul

mercato verso cui il prodotto è destinato: è, quindi, compreso anche il collo se non rimasto unito alla carcassa (Catellani 2017).



Figura 11. Colli di tacchino

4. Caratteristiche microbiologiche e pericoli

Le frattaglie sono prodotti con un'attività dell'acqua molto elevata (≥ 0.999) e con pH vicino alla neutralità, ma non $< 6,0$ eccetto che per trippa e centopelli, come mostrato in Tabella 4, che fanno sì che siano un terreno assai favorevole allo sviluppo microbico. Inoltre, i tessuti che le costituiscono sono cedevoli e facilmente attaccabili a causa della ridotta consistenza, sebbene sia comunque presente una certa quantità di tessuto connettivo. Tra le componenti degli organi prevalgono quelle a basso peso molecolare, più facilmente utilizzabili dai microrganismi (glucosio, vitamine, oligoelementi, oligopeptidi e aminoacidi liberi).

Tabella 4. Valori *post-mortem* dei pH medi dei tessuti considerando nell'insieme le varie specie animali (Catellani 2017)

	pH (medio) <i>post mortem</i>		pH (medio) <i>post mortem</i>
Filetto	5,60	Rumine	6,20
Cuore	5,70	Stomaco	1,50-3,00
Lingua	6,00	Tenue	7,70
Fegato	6,30	Colon	8,15
Polmoni	6,69	Timo	7,30
Reni	6,80	Pancreas	8,30
Milza	6,90	Utero	7,15
Cervello	7,00	Sangue	7,30

L'unico ostacolo per tenere sotto controllo lo sviluppo microbico è quindi la temperatura, che deve essere mantenuta a 3°C dal macello per tutte le fasi successive, come stabilito dal Regolamento (CE) 853/2004. La flora è rappresentata, per la parte alterante, da *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, batteri lattici tra cui *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp., *Weissella viridescens*, *Leuconostoc mesenteroides*, Enterobacteriaceae, *Staphylococcus* spp., coliformi fecali. Se gli alteranti superano un livello di 10^7 - 10^8 Log UFC/g o ml o cm^2 portano a modificazioni di colore e odore dei prodotti. Tra i patogeni, le fonti riportano la possibile presenza di *S. aureus*, *Salmonella*, *Campylobacter* (specialmente per le frattaglie degli avicoli), *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes*.

Di seguito è riportata una breve descrizione dei suddetti microrganismi o gruppi microbici.

4.1. *Pseudomonas* spp.

Si tratta di bacilli alteranti Gram negativi, aerobi obbligati, asporigeni e psicrotrofi (riescono a moltiplicare, anche se lentamente, fino a 3°C); sono poco resistenti al calore, in quanto non

sopravvivono a trattamenti termici oltre i 65-70°C per tempi superiori a 15-30 minuti. Non duplicano a pH <5,0, con rallentamento della moltiplicazione già a pH di 5,8. Sono ubiquitari: si trovano in terreno, pulviscolo e acque superficiali e dall'ambiente passano agli animali in allevamento, specialmente sulla loro superficie esterna (Giaccone 2010, Tiecco 2001).

4.2. *Aeromonas* spp.

Tale genere comprende bastoncini Gram negativi sia mobili che non mobili anaerobi facoltativi e ossidasi positivi. Metabolizzano il glucosio sia per via fermentativa che respiratoria. È riscontrato soprattutto nelle acque di zone a clima caldo. Molte specie sono mesofile, ma comprende anche molte specie psicrotrofe (APAT 2003).

4.3. *Enterobacteriaceae*

La famiglia delle *Enterobacteriaceae* comprende microrganismi di forma bastoncellare, Gram negativi, asporigeni, anaerobi facoltativi che fermentano il glucosio producendo acidi, ossidasi negativi, catalasi positivi e prevalentemente mobili grazie a flagelli peritrichi. Rispetto agli altri batteri Gram negativi, non possiedono il citocromo-C-ossidasi. Vi si annoverano oltre 50 generi sia di alteranti che di patogeni alimentari, come *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*... (Tiecco 2001).

4.4. Coliformi fecali

Sono batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*; sono Gram negativi bastoncellari, non sporigeni, anaerobi facoltativi e fermentanti il lattosio con produzione di acidi e gas. Sono così definiti in quanto di *habitat* intestinale di animali a sangue caldo e sono indice di contaminazione fecale per alimenti ed acqua (Giaccone 2010, Tiecco 2001).

4.5. Batteri lattici

È un gruppo molto eterogeneo di batteri Gram positivi ubiquitari; presentano differenti morfologie (bacilli, cocci), sono non mobili e asporigeni; sono acido tolleranti e a volte acidofili, anaerobi aerotolleranti, catalasi negativi e si trovano specie sia termofile, sia mesofile, che psicrotrofe. Due importanti gruppi, che sono stati impiegati come parametri in questa tesi sono:

- *Streptococcus* spp.: sono cocci, anaerobi facoltativi, omofermentanti obbligati;

- *Lactobacillus* spp.: sono bacilli o coccobacilli, anaerobi facoltativi, acidurici o acidofili, distinti in tre gruppi in base alle capacità fermentative (omofermentanti obbligati, eterofermentanti facoltativi ed eterofermentanti obbligati).

4.6. *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus aureus*

Si tratta di batteri Gram positivi, anaerobi facoltativi, asporigeni, ossidasi negativi, catalasi positivi, poco esigenti dal punto di vista nutrizionale, costituiti da cocci disposti in grappoli irregolari. Sono mesofili con *optimum* di pH attorno alla neutralità (7,0-7,5) Sono alotolleranti poiché sono in grado di sopravvivere a concentrazioni di NaCl di 7,5%. Sono ubiquitari, ma si trovano soprattutto su pelle, ghiandole cutanee, capelli, mucose di bocca e mani: sono quindi indice di contaminazione secondaria.

In questo genere si annovera *Staphylococcus aureus* che è uno tra i batteri più resistenti a bassi valori di aw: riesce a moltiplicarsi anche in matrici con 8-10% di zucchero o sale, come mostrato in Tabella 5. È mesofilo, duplicando bene a 37°C e fino a 7°C, ma non a pH <4,8 (Giaccone e Colavita 2010). Può produrre enterotossine (A, B, C1, C2, D, E) molto termostabili (molte ore a 70-80°C, 30-60 minuti a 100°C) che, se superano la dose infettante di 1-2 µg (ma può scendere anche a 0,01 µg) provocano un'intossicazione con sintomatologia molto dolorosa che comporta nausea, vomito, diarrea, dolori addominali con assenza di febbre. La remissione è spontanea dopo 1-2 giorni, senza terapia e semmai con una reintegrazione salina. Le enterotossine non sono prodotte se la concentrazione del microrganismo è inferiore a 10⁵ Log UFC/g. Le complicazioni sono rare; può dare, pure, delle patologie non alimentari.

Tabella 5. Alcuni fattori di crescita e di tossigenesi di *S. aureus*

Fattore	Crescita	Produzione di enterotossine
Temperatura	6-46°C	10-45°C
Temperatura ottimale	37°C	40°C
pH	4-9,8	5-8
pH ottimale	6-7	6,5-7 (stabile)
NaCl	0-20%	0-10%
NaCl ottimale	0%	0%
aw	0,83- >0,99	0,86- >0,99
aw ottimale	>0,99	>0,99

Lo si riscontra soprattutto in cibi cotti e contaminati dopo la cottura, in prodotti non cotti adeguatamente, specialmente quelli preparati in anticipo e mantenuti caldi (come nelle mense) o non raffreddati tempestivamente, ma anche in carni (sia fresche che in insaccati), pesci e

molluschi, alimenti a base di uova, salse, latte, formaggi freschi e alimenti *ready-to-eat* (Tiecco 2001, Giaccone e Colavita 2010).

4.7. Campylobacter

In questo genere esistono molte specie, ma il microrganismo di interesse maggiore come patogeno alimentare emergente è il *Campylobacter jejuni*, responsabile di patologie gastroenteriche. Si tratta di batteri Gram negativi, bastoncellari a forma spiralata, asporigeni, catalasi positivi, ossidasi positivi, microaerofili (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂, ma non crescono se la concentrazione di ossigeno scende sotto il 3%) e molto esigenti dal punto di vista metabolico. Non fermentano gli zuccheri, ma hanno metabolismo aerobio. Crescono tra 30 e 45°C con *optimum* a 42°C; sono sensibile al calore (D₅₅=1 minuto con z=5°C), resistono bene a temperatura di refrigerazione e non crescono al di sopra del 2% di sale. L'isolamento risulta difficile a causa delle caratteristiche del batterio.

Dopo un'incubazione di 1-10 giorni la patologia si manifesta come un'enterocolite di modesta gravità. La remissione è spontanea dopo circa una settimana e scarse sono le complicanze.

Le matrici in cui è riscontrato il microrganismo sono gli avicoli e i prodotti da essi derivati (soprattutto polli e tacchini, ma anche uccelli e animali domestici), latte crudo e acque non clorate (Tiecco 2001, Giaccone e Colavita 2010).

4.8. Yersinia enterocolitica

Appartiene alla famiglia delle Enterobacteriaceae e comprende sia ceppi innocui che patogeni. Ha tendenze psicrotrofe con *optimum* di crescita a 28-32°C e crescita rallentata a 37°C; è in grado di riprodursi anche a temperatura di refrigerazione con buona resistenza al congelamento. A 37°C è immobile (nell'uomo) e mobile nell'ambiente a 30°C. Produce un'enterotossina termostabile a 30°C, ma non a 37°C. La patologia prevale nei bambini con sintomi dopo 24-48 ore, con possibili complicanze nei soggetti a rischio (setticemia); sono, inoltre, possibili processi invasivi a carico dell'epitelio intestinale.

Le matrici in cui si riscontra sono varie: suini, prodotti carnei, latte e derivati, vegetazione, suolo e acqua potabile. È indice di contaminazione fecale in quanto il serbatoio principale è l'intestino in particolar modo del suino (Tiecco 2001, Giaccone e Colavita 2010).

4.9. Salmonella

Appartiene alle Enterobacteriaceae; è un batterio mesofilo con possibili tendenze psicrotrofe, con temperatura massima di crescita di 45-47°C. È termosensibile con $D_{65} \leq 0,1-2$ minuti e sensibile a NaCl e l'aw minima per la moltiplicazione è 0,93. Si conserva a lungo nell'ambiente, non fermenta il lattosio ed è facilmente ucciso dalle radiazioni.

Possiede endotossine e produce un'enterotossina con azione colera-simile e una citotossina. È possibile la penetrazione nell'epitelio intestinale con ulcerazioni che possono portare a setticemia. Determina una tossinfezione da una gastroenterite febbrile che dà remissione spontanea dopo qualche giorno. Si procede con una terapia sintomatica

Serbatoi di *Salmonella* sono animali e uomo (malato o portatore). Le matrici più a rischio sono carne di pollo e prodotti a base di pollo crudi, carne cruda e prodotti carnei di bovino e suino, uova e prodotti a base di uova (gelati, creme, salse...ecc). Più raramente si riscontra anche in pesci crudi e molluschi, spezie di importazione e vegetali freschi contaminati tramite irrigazione e/o concimazione (Tiecco 2001, Giaccone e Colavita 2010).

4.10. Listeria monocytogenes

È un patogeno alimentare Gram positivo a forma bastoncellare, anaerobio facoltativo, mobile e asporigeno, catalasi positivo, ossidasi negativo ed emolitico. La specie comprende 12 serovar di cui il 4b è tra i più virulenti e diffusi. È mesofilo tendenzialmente psicrotrofo e presenta un $D_{70}=1-4$ minuti. Presenta un *optimum* di pH vicino alla neutralità (7,0-7,6). È resistente ai nitriti e il *minimum* di aw do 0,94.

Può determinare un'infezione: il batterio è molto invasivo e si conserva dentro i fagociti; può portare a varie patologie anche molto gravi a carico, soprattutto, delle meningi, ma anche di cervello, milza, cuore e fegato. Molto pericoloso è per le donne in gravidanza perché può comportare parto prematuro, malattie al feto e aborto. Si procede con terapia antibiotica.

È un microrganismo ubiquitario che spesso viene riscontrato in alimenti crudi come carne tritata, carne cruda bovina e suina, insaccati, pollame, latte, prodotti ittici, vegetali freschi e alimenti *ready-to-eat*. Ha una forte tendenza a formare biofilm ed è, quindi, frequentemente fonte di contaminazione secondaria (utensili, lamierini, punti morti dei macchinari, pavimenti, zone umide). È riscontrato anche in alimenti non sufficientemente trattati termicamente, come nel latte pastorizzato non correttamente (Tiecco 2001, Giaccone e Colavita 2010).

5. Possibili fonti di contaminazione microbica delle frattaglie

La contaminazione microbica delle frattaglie può avvenire in vari punti della filiera, principalmente a livello del macello, del trasporto e della manipolazione presso i punti vendita. Vengono, quindi, brevemente descritte le possibili modalità di contaminazione delle tre suddette fasi.

5.1. Macello

Fondamentale è che sia svolta correttamente la iugulazione dell'animale con un coltello pulito e disinfettato perché, se contaminato da batteri, questi possono essere veicolati in organi e tessuti perché il flusso circolatorio prosegue per qualche minuto. Inoltre, se il dissanguamento non avviene in modo opportuno, coaguli di sangue potrebbero rimanere nei visceri, specialmente nel cuore, costituendo un *pabulum* per la crescita microbica (Scanzani *et al.* 2008).

Un forte imbrattamento della carcassa può avvenire durante la fase di eviscerazione vera e propria: dapprima, nelle femmine, se le mammelle non vengono asportate subito e correttamente, la carcassa potrebbe imbrattarsi di latte; nel momento in cui si procede ad eviscerare, parte del contenuto intestinale del tratto digerente potrebbe imbrattare non solo la carcassa, ma anche i visceri. È importante per questo legare le due estremità del tratto per evitare fuoriuscite: a livello del cardias si utilizza un elastico per chiudere il lume dell'esofago; a livello dell'apertura anale, invece, viene applicato un sacchetto in modo da arginare eventuali fuoriuscite. Anche i coltelli, gli indumenti e gli utensili impiegati durante l'eviscerazione se non correttamente puliti e disinfettati possono apportare contaminazione al prodotto; fondamentale sarà pure una adeguata igiene del personale (Scanzani *et al.* 2008, Ghinelli 1975, Cohen *et al.* 2006, Kuan *et al.* 2013, Akkaya *et al.* 2012).

5.2. Trasporto

Le criticità del trasporto delle frattaglie sono legate allo stoccaggio dei prodotti all'interno di container non puliti e disinfettati con conseguente contaminazione crociata; fondamentale sarà quindi dopo ogni trasporto e/o prima di ogni nuovo trasporto, sanificare il mezzo. Inoltre, il mancato rispetto della catena del freddo (le frattaglie devono essere mantenute a 3°C, secondo il Regolamento (CE) 853/2004) può portare ad un notevole aumento della carica microbica presente (Akkaya *et al.* 2013, Kuan *et al.* 2014, Kuan *et al.* 2013).

5.3.Punti vendita

A livello dei punti vendita, le frattaglie vengono eventualmente toelettate, rifilate, affettate o porzionate e confezionate sottovuoto (normalmente il centopelli) o preincartate in vaschette di polistirene avvolte in film plastici. La contaminazione può avvenire soprattutto per scorretta igiene del personale e dell'ambiente di lavorazione, degli indumenti, dei coltelli e degli utensili impiegati (specialmente per i prodotti più processati come quelli tagliati in fette o a strisce). È possibile che vi sia, inoltre, contaminazione crociata con altri prodotti alimentari lavorati in quell'ambiente, per cui risulta fondamentale l'organizzazione e la successione delle lavorazioni, oltre che l'implementazione dell'igiene di personale, ambienti e strumenti (Kuan *et al.* 2013, Cohen *et al.* 2006, Kuan *et al.* 2013, Akkaya *et al.* 2012).

PARTE SPERIMENTALE

6. Materiali e metodi

6.1. Materiali

Il campionamento è stato effettuato presso tre punti vendita della Grande Distribuzione della provincia di Verona nei mesi di giugno e di luglio 2017. L'ubicazione e l'organizzazione delle frattaglie è risultata diversa per ognuno:

- Supermercato A: stabile di media grandezza che non presenta una sezione *ad hoc* per le frattaglie, ma queste sono divise nei vari settori adibiti alle varie specie; i banchi frigo sono aperti e non protetti da ante;
- Supermercato B: di dimensioni paragonabili al precedente, presenta una sezione distinta per frattaglie di bovino e suino; quelle avicole sono situate nei settori relativi alle carni della suddetta categoria. I banchi frigo sono aperti e non protetti da ante;
- Supermercato C: punto vendita ampio, fornito e molto frequentato, presenta un'ampia selezione di frattaglie, poste in una sezione dedicata, eccetto che quelle avicole (ubicate nella sezione della carne avicola), non protetta da ante.

I campioni sono stati scelti sulla base della disponibilità dei materiali sul mercato, dato che, di settimana in settimana, in nessuno dei luoghi di campionamento risultavano disponibili tutte le tipologie che verranno descritte. Sono state scelte, principalmente, frattaglie di avicoli, bovini e suini. I campioni raccolti sono 57, la maggior parte dei quali preincartati nel punto vendita in vaschetta di polistirene e film di polietilene e solo alcuni in atmosfera protettiva e sottovuoto, come mostrato in Tabella 6. La quasi totalità dei prodotti erano crudi, eccetto la trippa e alcuni nervetti, che risultavano precotti. Sono stati regolarmente acquistati, mantenuti in borsa frigorifera con ghiaccio sia nei tempi di attesa per il pagamento, sia durante il trasporto, effettuato nel più breve tempo possibile, verso il laboratorio; sono stati quindi posti a temperatura di refrigerazione fino al momento delle analisi.

Tabella 6. Tipologie di campioni analizzate

Razza/Categoria	Tipologia	N° campioni	Confezionamento
Bovino adulto	Trippa precotta	5	Preincartato
	Trippa decongelata	1	Preincartato
	Centopelli	2	Sottovuoto
	Lingua	4	Preincartato
	Nervetti precotti	2	Preincartato
	Nervetti crudi	1	Preincartato
	Fegato	3	Preincartato
Vitello	Cuore	2	Preincartato
	Fegato	4	Preincartato
	Rene	2	Preincartato
	Polmone	1	Preincartato
	Cervella	2	Preincartato
Suino	Fegato	4	Preincartato
	Cuore	5	Preincartato
	Lingua	3	Preincartato
	Rete	3	Preincartato
Pollo	Durelli	3	Preincartato/Atmosfera protettiva
	Fegati	2	Atmosfera protettiva
	Fegati e cuori	2	Preincartato
Tacchino	Durelli	1	Preincartato
	Cuori	1	Preincartato
	Colli	3	Preincartato
Coniglio	Fegato	1	Preincartato

6.2. Metodi

I campioni sono stati processati mediante analisi microbiologiche qualitative e quantitative, determinazione del pH e test biochimici per confermare i risultati microbiologici, utilizzando, per ciascun parametro, le metodiche ISO utilizzate presso il laboratorio di Microbiologia degli Alimenti del Dip. MAPS di Agripolis.

Preparazione dei campioni

Per ciascuno dei campioni, per le analisi quantitative, si prelevano, con forbici e pinze sterili, sotto becco Bunsen, 20 g di prodotto da inserire in un sacchetto da Stomacher con 180 g di soluzione fisiologica (peptone 0,15%, NaCl 0,85%), il quale viene omogeneizzato in uno Stomacher 400 per un minuto. Da questo, che rappresenta la soluzione madre diluita 1:10, sotto cappa biologica a flusso laminare, vengono prodotte le diluizioni seriali utilizzando provette con 9 ml di soluzione fisiologica, in cui viene inserito 1 ml della diluizione precedente per ottenere quella successiva fino alla diluizione di 10^{-8} . Sono, quindi, seminati 0,1 ml delle

diluizioni considerate in piastre Petri per terreni da seminare per spatolamento, mentre 1 ml per i terreni utilizzati per l'inclusione in piastre Petri vergini.

Per le analisi qualitative di *Listeria* e *Salmonella* e l'analisi quantitativa di *Listeria*, sono prelevati 25 g di campione e messi sterilmente in un barattolo in cui sono aggiunti 225 ml di *Buffered Peptone Water* (BPW: peptone 0,1%, NaCl 0,85%). I barattoli vengono lasciati a temperatura ambiente per 1-4 ore, e utilizzati, quindi, per l'analisi quantitativa di *Listeria* e poi incubati a 37°C per 24 ore per le successive analisi qualitative di *Salmonella* e *Listeria*.

Carica microbica totale

Per analizzare il livello di contaminazione microbica generale dei campioni di frattaglie, è stato utilizzato il terreno *Plate Count Agar* (PCA), terreno non selettivo utilizzato tramite inclusione. Le piastre vanno incubate a 31°C per 48-72 ore, con lettura parziale a 24 ore e conferma a 48 e 72 ore. Sono state prese in considerazione tutte le colonie cresciute al di sotto del sovrastrato, che si presentavano bianche, come in Figura 12.

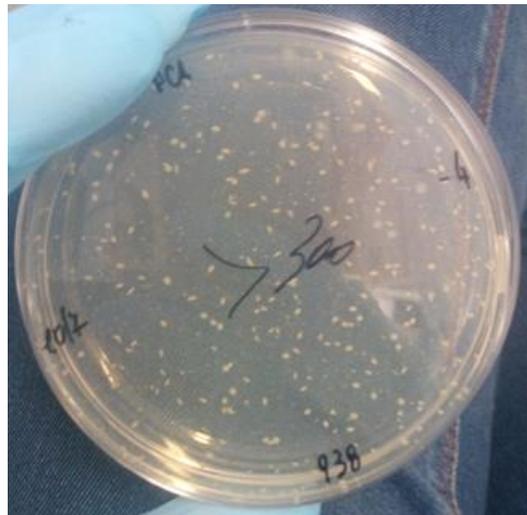


Figura 12. Colonie bianche considerate per la conta microbica totale

Ricerca di Enterobacteriaceae

Per l'isolamento e il conteggio delle Enterobacteriaceae nei campioni è stato impiegato il *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBG), terreno selettivo e differenziale che presenta il glucosio come zucchero fermentabile e che determina la crescita di colonie rosso-viola con o senza alone di precipitazione dei sali biliari con diametro pari o superiore a 0,5 mm. La semina è fatta per

inclusione, incubando a 37°C per 24 ore, con conferma di lettura dopo 48 ore di incubazione. Il conteggio delle colonie è stato fatto considerando le colonie rosso-viola, cresciute sotto il sovrastrato di terreno, come quelle in Figura 13.

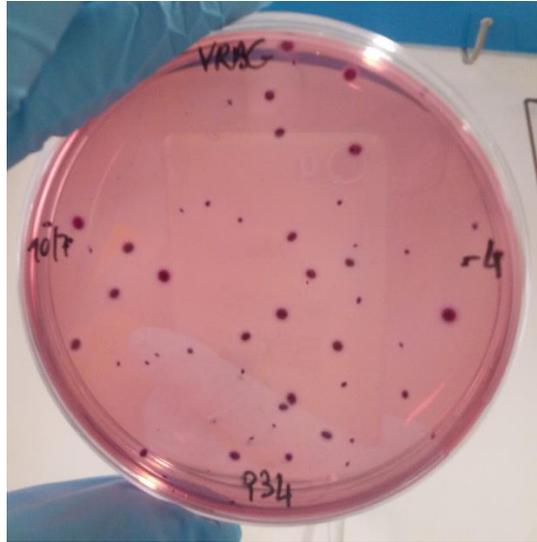


Figura 13. Colonie di Enterobacteriaceae

Ricerca di coliformi fecali

Per la ricerca e il conteggio di batteri coliformi fecali, sono stati impiegati due terreni selettivi per inclusione: il *Violet Red Bile Lactose Agar* (VRBL) e il *Chromocult E. coli*. Le piastre sono state incubate a 42°C per 24 ore con conferma di lettura a 48 ore, considerando le colonie di color violetto, con diametro pari o superiore a 0,5 mm. Per gli ultimi 17 campioni è stato impiegato il *Chromocult E. coli*, per inclusione, incubando le piastre a 42°C per 24 ore con conferma di lettura a 48 ore. Le colonie di colore rosa e rosa salmone sono state conteggiate come coliformi fecali, mentre quelle di colore blu-violaceo sono state considerate come *Escherichia coli*, come si evince dalla Figura 14.

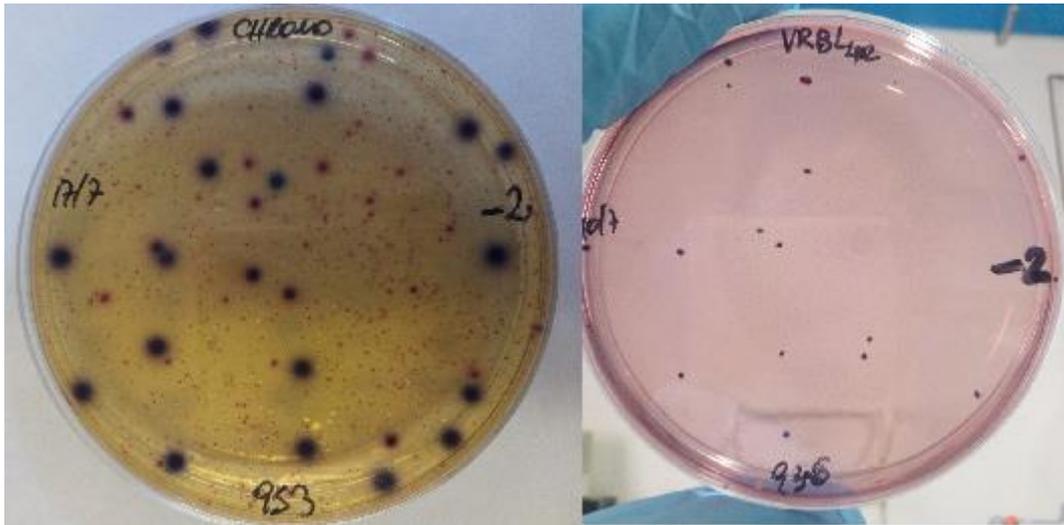


Figura 14. Colonie di coliformi fecali (rosa) e di *E. coli* (blu-viola)

Ricerca di *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp.

Per la ricerca di batteri lattici, sono stati impiegati *MRS Broth* addizionato con Agar per l'isolamento e il conteggio di *Lactobacillus* spp. e *M17* per *Streptococcus* spp. per inclusione, come mostrato in Figura 15. Le piastre vengono incubate in condizioni di anaerobiosi, impiegando le buste AnaeroGen™, a 37°C per 72 ore, con controllo a 24 e 48 ore. Sono state prese in considerazione tutte le colonie cresciute al di sotto il secondo strato di terreno.

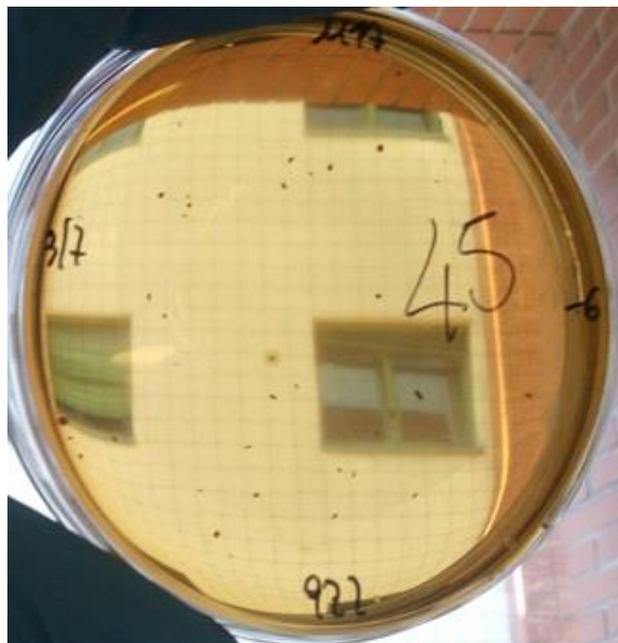


Figura 15. Colonie di *Streptococcus* spp.

Ricerca di *Staphylococcus* spp.

Il terreno *Mannitol Salt Agar* (MSA), è stato utilizzato per la ricerca e il conteggio di Stafilococchi coagulasi positivi e *S. aureus*: la semina avviene per spatolamento, incubando le piastre a 37°C per 48 ore, con controllo a 24 ore. Le colonie di colore giallo e la cui crescita determina un viraggio del terreno al giallo, sono state considerate come sospetti *S. aureus*, mentre quelle rosa e che non hanno dato viraggio del terreno, sono state conteggiate come *Staphylococcus* spp., come mostrato in Figura 16.

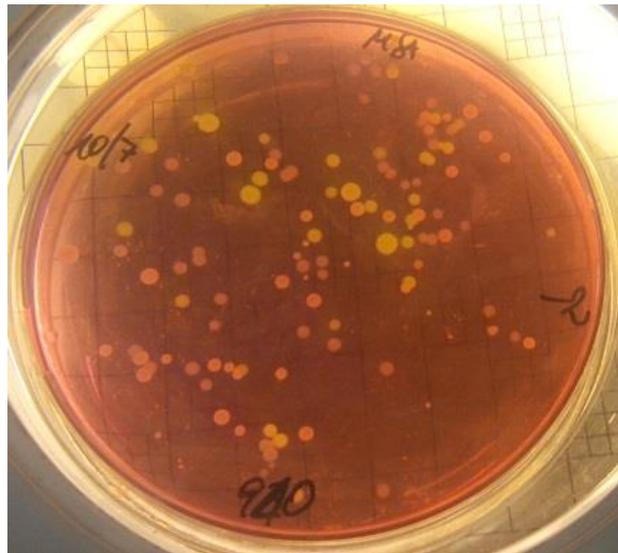


Figura 16. Colonie di *Staphylococcus* spp. (rosa) e di sospetti *S. aureus* (giallo)

Ricerca di *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp.

Per la ricerca e il conteggio dei batteri alteranti *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp. si utilizza il terreno *Pseudomonas Aeromonas Selective Agar acc. to Kielwein, Glutamate Starch Phenol Red Agar* (GSP); la semina è effettuata per spatolamento con incubazione per 72 ore a 28°C e controllo a 48 ore. Le colonie gialle sono classificate come *Aeromonas* spp., mentre quelle rosa *Pseudomonas* spp., come mostrato in Figura 17.

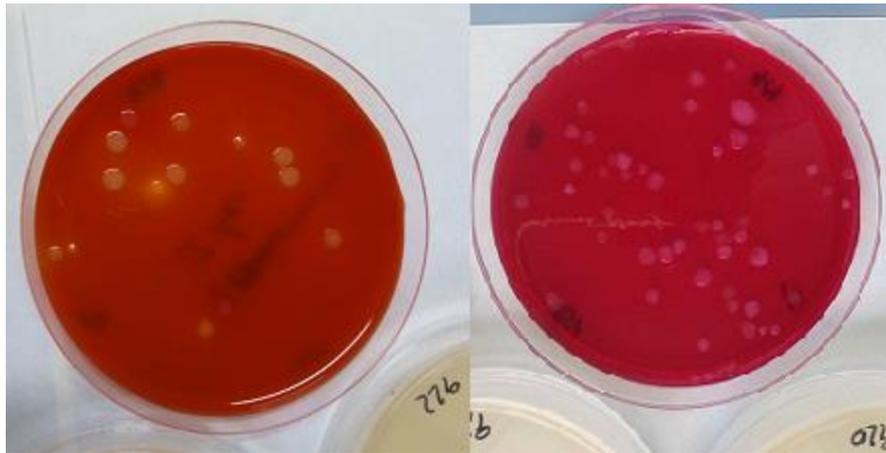


Figura 17. Colonie di *Aeromonas* spp. (sinistra), *Pseudomonas* spp. (destra)

Ricerca di Salmonella

Dopo un pre-arricchimento non selettivo di 25 g di campione in 225 ml di *Buffered Peptone Water* (BPW: peptone 0,1%, NaCl 0,85%) per 24 ore a 37°C e dopo aver agitato con un vortex, per ogni campione, sotto cappa biologica a flusso laminare, sono prelevati 100 µl e inseriti, sterilmente, in 9 ml di *Rappaport Vassiliadis Broth* (RV), un brodo di arricchimento selettivo, mostrato in Figura 18. Le provette vengono incubate a 42°C per 24 ore. Un viraggio del brodo verso un colore trasparente è indice di possibile presenza di *Salmonella*. Dopo aver agitato con il vortex, per ogni campione, anche quelli non virati, è stata fatta semina con ansa con il metodo dei quattro quadranti su terreno selettivo *Xylose-Lysine-Tergitol 4* (XLT4), incubando le piastre a 37°C per 24 ore. Per conferma, le piastre sono state incubate fino a 48 ore. Le colonie con crescita nera sono state considerate come colonie sospette di *Salmonella*.



Figura 18. Provette dei campioni in RV (sinistra) e piastra di XLT4 (destra)

Ricerca di *Listeria*

○ Ricerca quantitativa

Dopo aver messo 25 g di campione in 225 ml di *Buffered Peptone Water* (BPW: peptone 0,15%, NaCl 0,85%) in barattoli sterili, questi sono stati mantenuti a temperatura ambiente per 1-4 ore. Dopo aver agitato con il vortex, sono stati prelevati 100 µl e seminati per spatolamento su piastre di *Agar Listeria acc. to Ottaviani & Agosti* (ALOA), terreno cromogenico selettivo e differenziale per la determinazione e il conteggio di *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore, con conferma di lettura a 48 ore. Sono state considerate le colonie di colore verde-azzurro senza alone per *Listeria* spp., con alone per *L. monocytogenes*.

○ Ricerca qualitativa

Dopo aver fatto un pre-arricchimento non selettivo di 25 g di campione in 225 ml di *Buffered Peptone Water* (BPW: peptone 0,1%, NaCl 0,85%) per 24 ore a 37°C e dopo aver agitato con un vortex, per ogni campione, sotto cappa biologica a flusso laminare, si preleva 1 µl e si inserisce, sterilmente, in 9 ml di *FRASER Broth*, un brodo di arricchimento selettivo. Le provette vengono incubate a 31°C per 24 ore. Un viraggio del brodo verso un colore bruno opaco è indice di possibile presenza di *Listeria*. Dopo aver agitato con il vortex, per ogni campione, è eseguita la semina con ansa con il metodo dei quattro quadranti su terreno selettivo e differenziale *Agar Listeria acc. to Ottaviani & Agosti* (ALOA), incubando le piastre a 37°C per 24 ore. Per conferma, le piastre sono state incubate fino a 48 ore. Sono state considerate le colonie di colore verde-azzurro, come mostrato in Figura 19, senza alone per *Listeria* spp., con alone per *L. monocytogenes*.

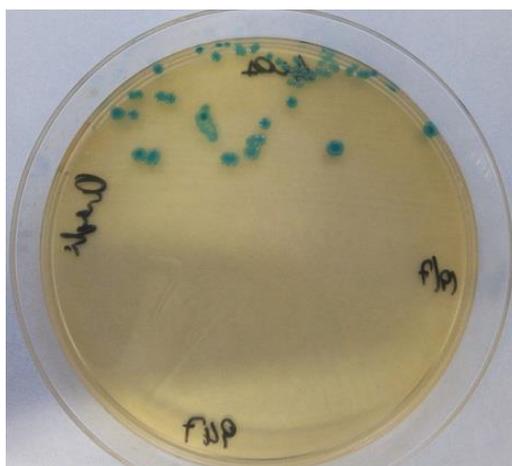


Figura 19. Piastra di ALOA con colonie di *Listeria* spp.

Tutte le principali informazioni, evinte dalle rispettive schede tecniche fornite dal laboratorio e dalle specifiche metodiche ISO di ricerca relative ai terreni impiegati per le analisi di questo lavoro, (microrganismi, tempi e temperature di incubazione) sono riassunte in Tabella 7.

Tabella 7. Tipologie di terreni impegnati

Terreno	Microrganismo	Temperatura incubazione	Tempo incubazione	Colonie caratteristiche
VRBG	Coliformi totali	37°C	24 ore	Rosso-viola
VRBL	Coliformi fecali	42°C	24 ore	Rosso-viola
Chromocult <i>E. coli</i>	Coliformi fecali, <i>E.coli</i>	42°C	24 ore	Rosa Blu-violaceo
PCA	Conta microbica totale	31°C	48-72 ore	Bianche
MRS	<i>Lactobacilli</i>	37°C	72 ore	Bianche
M17	<i>Streptococci</i>	37°C	72 ore	Bianche
MSA	<i>Staphylococcus</i> spp. <i>S. aureus</i>	37°C	48 ore	Rosa Gialle
GSP	<i>Pseudomonas</i>	28°C	72 ore	Rosa-fucsia
GSP	<i>Aeromonas</i>	28°C	72 ore	Giallo

Test biochimici e determinazione del pH

Test della catalasi

Si tratta di un test biochimico in macrometodo basato sulla produzione di un enzima, la catalasi (appartenente alle ossidoreduttasi), coinvolto nella detossificazione della cellula da specie reattive dell'ossigeno e prodotto da molti batteri, soprattutto aerobi, ma anche alcuni anaerobi facoltativi. Catalizza la seguente reazione:



Si procede mettendo una goccia di perossido di idrogeno su una piastra vergine; dopo aver prelevato con un'ansa una colonia di coltura pura, stemperarla nel reattivo: la reazione, se il microrganismo è catalasi positivo, avviene in pochi secondi con produzione di gas più o meno abbondante, come mostrato in Figura 20. È stato maggiormente utilizzato per *Staphylococcus* spp., *Aeromonas* spp. e *Pseudomonas* spp.

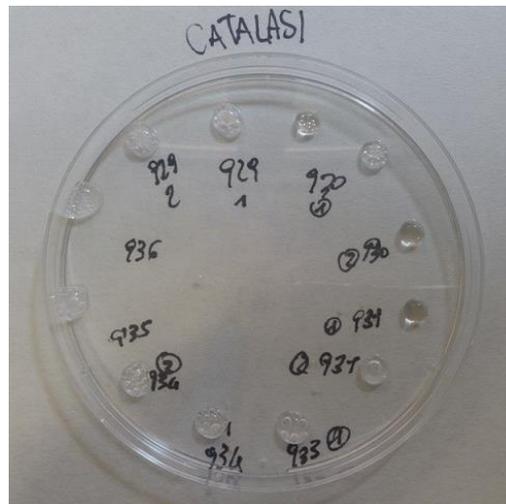


Figura 20. Test della catalasi su colonie di *Staphylococcus* spp.: risultato positivo

Test dell'ossidasi

È un test biochimico in macrometodo che serve ad evidenziare la presenza del citocromo-c (enzima citocromo ossidasi), fondamentale nella catena di trasporto degli elettroni della fosforilazione ossidativa. Si procede depositando una goccia di reattivo su un foglio di carta assorbente; con un'ansa, si preleva una colonia pura del microrganismo di interesse e la si stempera sulla carta imbibita di reattivo. La positività della reazione, come mostrato in Figura 21, è data dalla comparsa di una colorazione porpora e violacea, dopo 10-30 secondi. È stato effettuato soprattutto per identificare *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp., per i quali può essere richiesto un maggior tempo per lo sviluppo di positività.

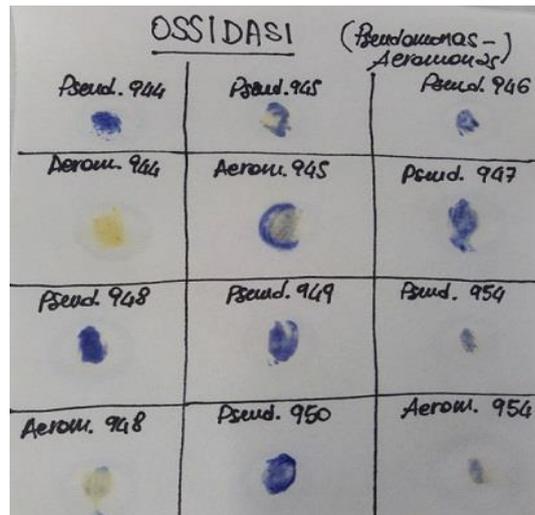


Figura 21. Test dell'ossidasi su colonie di *Aeromonas* spp. e *Pseudomonas* spp.

Test dell'indolo

L'indolo è un composto derivante dalla degradazione del triptofano; viene prodotto dai microrganismi che possiedono l'enzima triptofanasi che idrolizza il triptofano producendo indolo, acido piruvico e ammoniaca. Si procede coltivando provette di *Sulfide, Indole, Motility Agar* (SIM Agar) seminate tramite infissione dell'ago di un'ansa con cui si è prelevata una colonia pura del microrganismo di interesse e incubando a 30-37°C per 24 ore. Si inseriscono, quindi, 3 gocce di reattivo di Kovacs per ogni provetta; la reazione è istantanea e può essere:

- Reazione positiva: comparsa di un anello rosso-violaceo in superficie;
- Reazione negativa: comparsa di un anello giallognolo o incolore;

Il test, mostrato in Figura 22, è stato eseguito per identificazione di colonie di sospetta *Salmonella*, *Aeromonas* spp. e *Pseudomonas* spp.

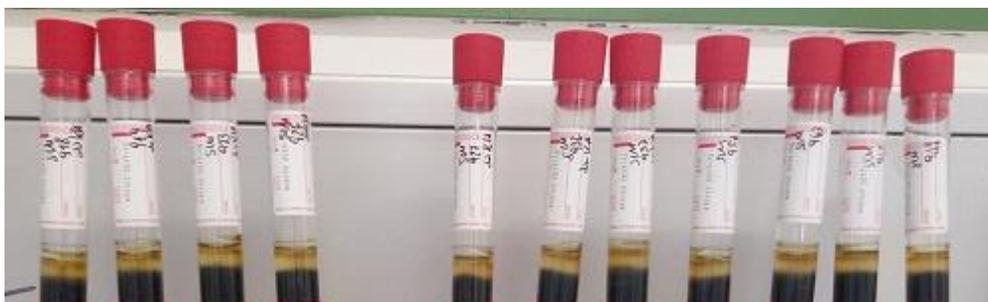


Figura 22. Test dell'indolo su colonie di sospetta *Salmonella*: risultato negativo

Test dell'ureasi

Per questo test vengono impiegate delle provette con terreno *Urea Agar Base-Christensen* a becco di clarino. Viene impiegato per determinare se il microrganismo di interesse ha attività ureasica, ovvero se idrolizza l'urea producendo ioni ammonio con viraggio dell'indicatore verso il rosso-ciclamino (pH alcalino) dopo incubazione di 6-24 ore. La semina deve essere fatta in maniera pesante in superficie dopo aver prelevato il microrganismo di interesse con un'ansa. Il test, mostrato in Figura 23, è stato effettuato per le colonie di sospetta *Salmonella* e per *Aeromonas* spp. e *Pseudomonas* spp.

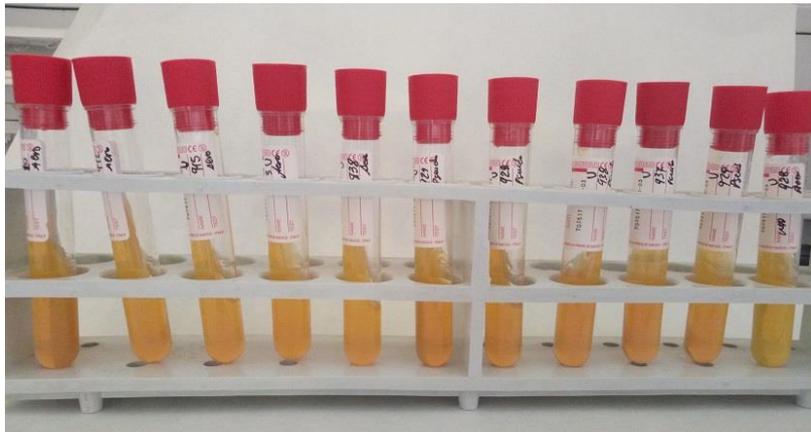


Figura 23. Test dell'ureasi su colonie di sospetta *Salmonella*: risultato negativo

Test di decarbossilazione della L-lisina

Il test è eseguito utilizzando un brodo costituito da peptone, estratto di lievito, glucosio e un colorante che gli conferisce un colore viola (come il porpora bromocresolo). Il glucosio presente, se viene fermentato dai batteri, determina un viraggio del brodo al giallo e il mezzo, reso acido, favorisce la reazione di decarbossilazione della lisina con formazione dell'ammina corrispondente (cadaverina). La prova, mostrata in Figura 24, è stata svolta per colonie sospette di *Salmonella* e per *Aeromonas* spp. e *Pseudomonas* spp.

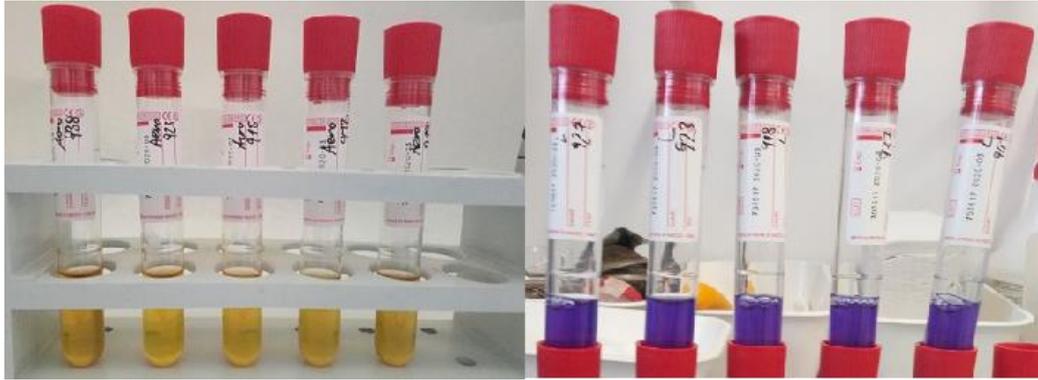


Figura 24. Test di decarbossilazione di L-lisina su colonie: risultato negativo (sinistra) e positivo (destra)

Mobilità

Per saggiare la mobilità dei microrganismi di interesse, in particolar modo di *Aeromonas* spp., ci si avvale del metodo della goccia pendente tramite l'ausilio di una cellula di Koch, vetrino con una escavazione emisferica al centro. Attorno ai bordi della concavità può, eventualmente, essere spalmato del silicone al fine di mantenere più saldamente adeso il vetrino copri oggetto che poi verrà appoggiato. Dopo aver preparato una soluzione batterica, stemperando in un po' di soluzione fisiologica la colonia di interesse, una goccia va posta su un vetrino copri oggetto. Una volta fatto questo, la cellula di Koch viene appoggiata sopra il vetrino porta oggetto, facendo aderire il silicone. Con un movimento deciso, si rovescia il tutto, per poter poi osservare al microscopio se è presente una eventuale mobilità. Per facilitare la visualizzazione, è possibile aggiungere, nella sospensione batterica, un colorante.

Fermentazione degli zuccheri

Per l'identificazione microbica tramite la fermentazione degli zuccheri vengono impiegate provette con il terreno *Kligler Iron Agar* (KIA) a becco di clarino. I microrganismi si distinguono per la loro capacità di fermentare il glucosio e il lattosio e di produrre idrogeno solforato. Grazie alla forma a becco di clarino, la fermentazione può avvenire sia in ambiente aerobio sullo *slant* sia in ambiente anaerobio in profondità; è possibile, inoltre, che vi sia o meno produzione di gas. Per la fermentazione degli zuccheri, possono verificarsi 3 casi, dopo 18-24 ore di incubazione:

- Fermentazione del glucosio: reazione alcalina sullo *slant* e viraggio del terreno verso il rosso e reazione acida in profondità con viraggio verso il giallo;
- Fermentazione del glucosio e del lattosio: reazione acida sia in superficie che in profondità con viraggio del terreno al giallo;
- Nessuna fermentazione: reazione alcuna sia in superficie che in profondità;

Può essere evidenziata anche la produzione di idrogeno solforato a partire dal sodio tiosolfato quando l'ambiente è acido. Esso si evidenzia grazie ad un indicatore, il ferro ammonio citrato, che in presenza di H₂S, precipita come ferro solfuro nero, come mostrato in Figura 25. Tale terreno è stato utilizzato per conferma di identificazione di sospette *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., e *Salmonella*. La semina prevede di infiggere l'ago dell'ansa, su cui è stata caricata una colonia pura del microorganismo di interesse, in profondità nel terreno, strisciando poi in superficie. Le provette sono poi incubate, per 18-24 ore, per *Salmonella* a 37°C, per *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp. a 28°C.

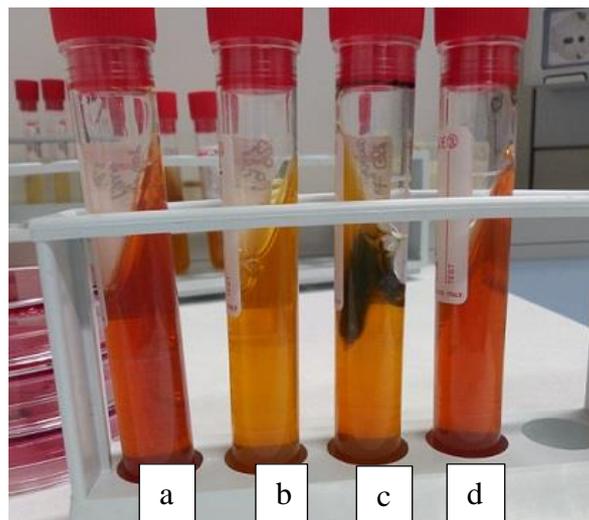


Figura 25. Campioni di KIA di sospette *Pseudomonas* spp. (a, d), *Aeromonas* spp. (b) e *Salmonella* (c, con produzione di H₂S)

Determinazione del pH

Per la misurazione del valore di pH dei campioni è stato utilizzato uno strumento Seven Compact™ 8220 (Mettler Toledo) dotato di sonda in grado di essere usata per infissione in campioni solidi, sia per rilevare il pH in soluzioni. Per la maggior parte dei campioni è stato rilevato tramite infissione, mentre per alcuni, una parte del campione è stata prelevata, omogeneizzata, posta su una carta filtrante e vi è stata fatta scorrere dell'acqua distillata; il tutto

è stato lasciato decantare per circa un'ora, in modo che i sali dilavati venissero raccolti in una vaschetta sottostante. La rilevazione del pH è stata fatta su questa soluzione. In ambedue i casi, sono state fatte tre ripetizioni, delle quali, poi, è stata calcolata la media.

Elaborazione statistica

I dati ottenuti sono stati inseriti in un foglio Excel, organizzandoli sulla base della matrice alimentare, del tipo di animale, della scadenza, della presentazione del prodotto, del confezionamento, del negozio e del trattamento del prodotto prima della vendita (crudo o cotto). Sono stati trasformati in scala logaritmica e per l'elaborazione statistica è stato impiegato il sistema SAS. Per tipo di animale, negozio, matrice del campione, presentazione e giorni dalla produzione e dalla scadenza si è impiegato il modello ANOVA con $p < 0.05$ (livello di significatività). Per i dati di *Listeria* qualitativa ci si è avvalsi dell'ausilio del confronto tra proporzioni, mediante il test del Chi-quadro con $p < 0,01$. È stata, poi, approntata l'analisi multivariata della correlazione di Pearson tra i vari parametri microbiologici quantitativi considerati e il pH con $p < 0,001$.

7. Risultati e discussione

Per quanto riguarda le analisi microbiologiche, le medie delle cariche microbiche sono state riportate con il corrispondente *p-value*, indicando, nel caso siano state riscontrate delle differenze significative, le lettere: *a* per i valori più elevati, *ab* per i valori intermedi, *b* per i valori più bassi. Nell'elaborazione alcuni campioni, dei quali non erano presenti sufficienti ripetizioni (ovvero almeno 2), come i nervetti crudi ed il polmone di vitello, non sono stati presi in considerazione, mentre alcuni sono stati accorpati ad altre categorie in modo da snellire l'analisi: i campioni di tacchino, pollo e coniglio sono confluiti nella categoria "pollame e coniglio"; i due centopelli, per affinità, sono stati considerati tra le trippe. Questo perché il campionamento ha comportato delle difficoltà nell'ottenere un numero sufficiente di ripetizioni per alcuni campioni, in quanto, nei punti vendita presi in considerazione, nel periodo di campionamento, non sempre erano disponibili tutte le tipologie. In Tabella 8, Tabella 9 e Tabella 10 sono riassunti rispettivamente i campioni considerandoli secondo la matrice e la specie animale, la matrice e il luogo di campionamento e i campioni in base alla tipologia di presentazione.

Tabella 8. Tipologie di campione distinte per tipo di animale

Matrice	Bovino	Pollame+coniglio	Suino	Vitello	Totale
Cervello				2	2
Colli		3			3
Cuore		1	5	2	8
Durelli		4			4
Fegato	3	3	4	4	14
Fegati e cuori		2			2
Lingua	5		2		7
Nervetti precotti	2				2
Rene				2	2
Rete			3		3
Trippa	8				8
Totale complessivo	18	13	14	10	55

Tabella 9. Tipologie di campione distinte in base ai luoghi di campionamento

Matrice	Supermercato A	Supermercato B	Supermercato C	Tot
Cervello			2	2
Colli	2	1		3
Cuore	2	2	4	8
Durelli	2	1	1	4
Fegato	5	4	5	14
Fegati e cuori		1	1	2
Lingua	2		5	7
Nervetti precotti			2	2
Rene			2	2
Rete			3	3
Trippa	2		6	8
Totale complessivo	15	9	31	55

Tabella 10. Tipologie di presentazione dei campioni, cui vanno detratti due campioni, perché non presentano ripetizioni: polmone e nervetti crudi

Presentazione	N° campioni
Fette	10
Intero	36
Strisce	11
Totale complessivo	57

Come si evince dai dati di Tabella 11 e Tabella 12, i prodotti che presentano un maggior livello di contaminazione, sono quelli prelevati presso il supermercato B, quindi, in questo potrebbe esserci un non completo controllo delle condizioni igieniche dell'ambiente di lavorazione, del personale, degli indumenti e degli utensili impiegati. Inoltre, non risulta una differenza netta di contaminazione tra prodotti crudi e cotti, che, quindi, sono stati probabilmente re-inquinati dopo i trattamenti subiti.

Tabella 11. Carica microbica totale media dei prodotti in base al negozio di campionamento

Negozi	CMT media in Log UFC/g \pm Errore standard
Supermercato A	7,5 \pm 0,5
Supermercato B	8,1 \pm 0,6
Supermercato C	7,5 \pm 0,3

Tabella 12. Carica microbica media dei prodotti in base al processamento

Prodotto cotto/crudo	CMT media in Log UFC/g \pm Errore standard
Cotto	7,0 \pm 0,5
Crudo	7,6 \pm 0,2

Per nessuno dei parametri considerati sono state riscontrate delle differenze statisticamente significative considerando i giorni dalla data di produzione o dalla data di scadenza.

Per le colonie di sospetti *Staphylococcus aureus* non è stata eseguita la prova per la produzione della tossina, quindi non è possibile affermare con certezza che si tratti di *S. aureus*; di conseguenza le colonie sospetto ottenute, sono state considerate come *Staphylococcus spp.*

Si procede quindi con l'analisi dei dati ottenuti per ogni singolo parametro.

Conta microbica totale

Tabella 13. Carica microbica totale media delle tipologie di campione analizzate

Matrice campione	CMT medie (Log UFC/g) \pm Errore standard
Cervello	7,0 \pm 0,9
Colli	9,1 \pm 1,2
Cuore	7,7 \pm 0,5
Fegato	7,8 \pm 0,3
Lingua	7,9 \pm 0,5
Nervetti precotti	7,2 \pm 1,2
Rene	8,7 \pm 0,9
Rete	9,7 \pm 0,7
Trippa	7,2 \pm 0,5

Dall'elaborazione statistica non è risultata alcuna differenza significativa considerando l'effetto animale, negozio, presentazione, matrice e processamento (prodotto crudo o cotto). Per quanto concerne i prodotti cotti, parte della carica microbica è rappresentata da batteri lattici (*Streptococcus spp.* e *Lactobacillus spp.*), ma i dati relativi a questi sono pochi (come mostrato in Tabella 14) per ottenere delle differenze significative. Le CMT medie delle tipologie di matrici sono riportate in Tabella 13.

Tabella 14. Cariche medie di batteri lattici in trippe e centopelli in Log UFC/g

Matrice	Numero di campioni	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.
Trippa	6	6,3 ± 1,89	3,03 ± 1,03
Centopelli	2	5,3 ± 1,03	2,7 ± 0,89

Considerando l'analisi multivariata della Correlazione di Pearson ($p\text{-value}<0,001$), la conta microbica totale risulta correlata con le Enterobacteriaceae per il 46,3% con $p=0,0003$.

Enterobacteriaceae totali

Tabella 15. Contaminazione da Enterobacteriaceae media delle tipologie di campioni analizzate

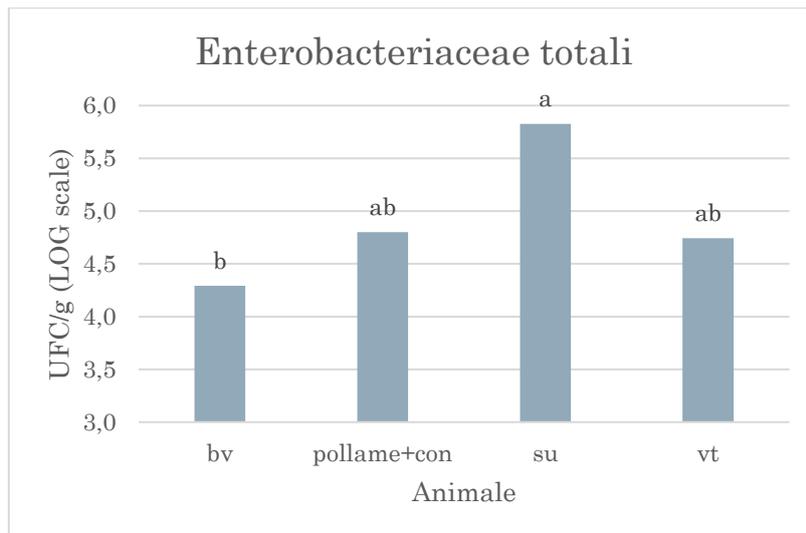
Matrice campione	Enterobacteriaceae tot medie (Log UFC/g) ± Errore standard
Cervello	4,6 ± 0,9
Colli	5,1 ± 0,7
Cuore	4,8 ± 0,4
Durelli	4,4 ± 0,6
Fegato	4,8 ± 0,3
Fegati e cuori	5,8 ± 0,9
Lingua	4,6 ± 0,5
Nervetti precotti	3,6 ± 0,9
Rene	5,5 ± 0,9
Rete	6,6 ± 0,7
Trippa	4,4 ± 0,5

In Tabella 15 sono mostrati i valori medi di Enterobacteriaceae secondo la tipologia di matrice. Per tale categoria di microrganismi sono risultate delle differenze statisticamente significative per quanto concerne la matrice e la tipologia di animale, con $p=0,0275$: è risultato, infatti, un livello di contaminazione nettamente maggiore per le frattaglie di suino analizzate, come mostrato in Tabella 16 e in Grafico 1.

Tabella 16. Contaminazione da Enterobacteriaceae in base al tipo di animale

Tipologia di animale	Enterobacteriaceae Tot medie (Log UFC/g) ± Errore standard
Bovino (bv)	4,3 ± 0,3
Pollame+con	4,8 ± 0,5
Suino (su)	5,8 ± 0,4
Vitello (vt)	4,7 ± 0,4

Grafico 1. Cariche medie di Enterobacteriaceae in base al tipo di animale.



Considerando l'analisi multivariata della Correlazione di Pearson ($p\text{-value}<0,001$), le Enterobacteriaceae totali risultano correlate con la conta microbica totale per il 46% con $p=0,0003$, con i coliformi fecali per il 71,7% con $p=0,0000$, con *Pseudomonas* spp. per il 46,6% con $p=0,0003$.

Coliformi fecali

Per il livello di contaminazione data da tali microrganismi, che sono tipici indicatori di contaminazione fecale, sono emerse delle differenze significative per quanto riguarda la matrice del campione, con $p=0,0084$, come visto in Tabella 17 e Grafico 2, e il tipo di presentazione dei prodotti, con $p=0,0119$ come risulta da Tabella 18 e Grafico 3.

Tabella 17. Cariche medie di coliformi fecali media delle tipologie di campioni analizzate

Matrice campione	Coliformi fecali medie (Log UFC/g) \pm Errore standard
Cervello	4,4 \pm 0,8
Colli	4,4 \pm 0,7
Cuore	4,6 \pm 0,4
Durelli	3,8 \pm 0,6
Fegato	4,6 \pm 0,3
Fegati e cuori	5,1 \pm 0,8
Lingua	4,7 \pm 0,5
Nervetti precotti	2,7 \pm 0,8
Rene	4,9 \pm 0,8
Rete	5,2 \pm 0,7
Trippa	2,5 \pm 0,4

Grafico 2. Contaminazione da coliformi fecali media delle tipologia di campioni analizzate

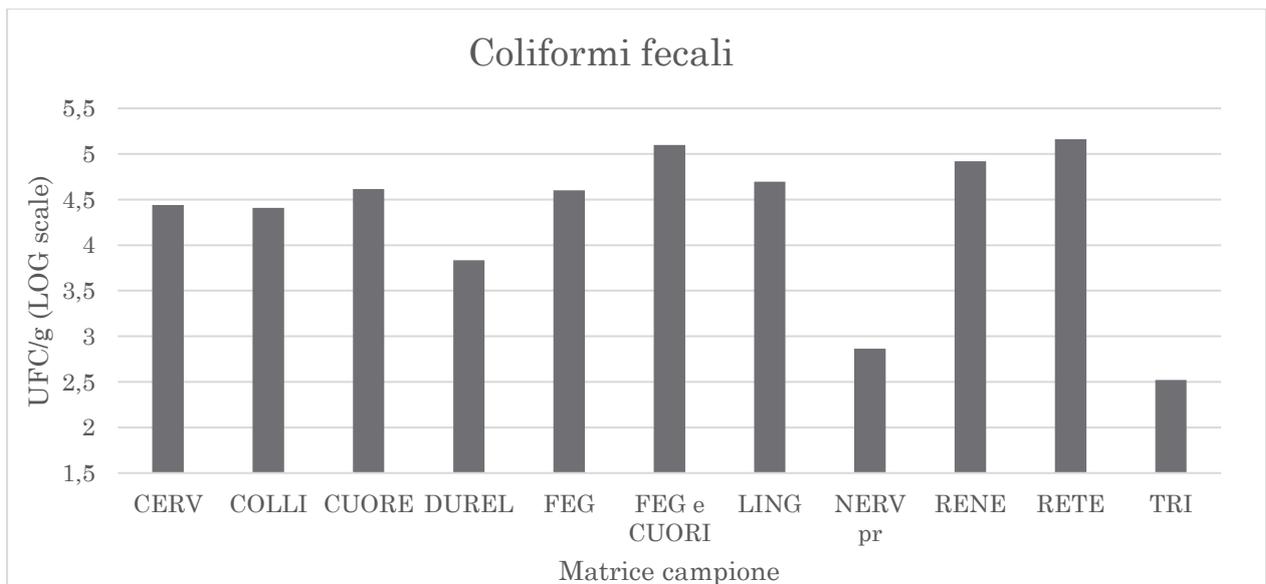
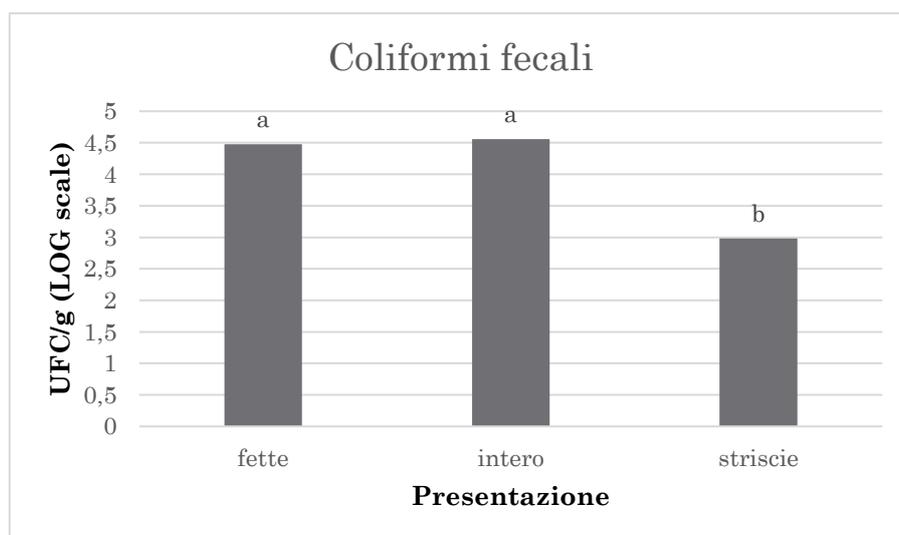


Tabella 18. Cariche medie di coliformi fecali media in base alla presentazione dei campioni

Presentazione	Coliformi fecali (Log UFC/g) \pm Errore standard
Fette	4,5 \pm 0,4
Intero	4,6 \pm 0,2
Strisce	3,0 \pm 0,5

Grafico 3. Contaminazione da coliformi fecali media in base alla presentazione dei campioni



Considerando l'analisi multivariata della Correlazione di Pearson ($p\text{-value}<0,001$), i coliformi fecali risultano direttamente correlati con le Enterobacteriaceae totali per il 71,7% con $p=0,0000$, con *Aeromonas* spp. per il 45,1% con $p=0,0004$ e inversamente correlati con il pH per il 48,0% con $p=0,0002$.

Stafilococchi

Per il tasso di contaminazione da Stafilococchi sia per *Staphylococcus* spp. che per *S. aureus*, che sono indice di contaminazione secondaria, sono state riscontrate delle differenze significative per la tipologia di animale, con, rispettivamente $p=0,0146$ e $p=0,0199$, con maggior contaminazione nelle frattaglie suine, come mostrato in Tabella 19 e in Grafico 4 e la matrice dei campioni, come mostrato in Grafico 5. Solo in uno dei campioni analizzati la carica di sospetti *S. aureus* superava 10^5 Log UFC/g, valore oltre il quale viene fatta la ricerca dell'enterotossina, che, questo caso non è stata approntata.

Tabella 19. Contaminazione da *Staphylococcus* spp. in base al tipo di animale

Tipologia animale	<i>Staphylococcus</i> spp. medie (Log UFC/g) \pm Errore standard
Bovino	$2,6 \pm 0,3$
Pollame+coniglio	$3,2 \pm 0,4$
Suino	$4,2 \pm 0,4$
Vitello	$3,0 \pm 0,4$

Grafico 4. Cariche medie di *Staphylococcus* spp. in base al tipo di animale. Bv=bovino; pollame+con=pollame più coniglio; su=suino; vt=vitello

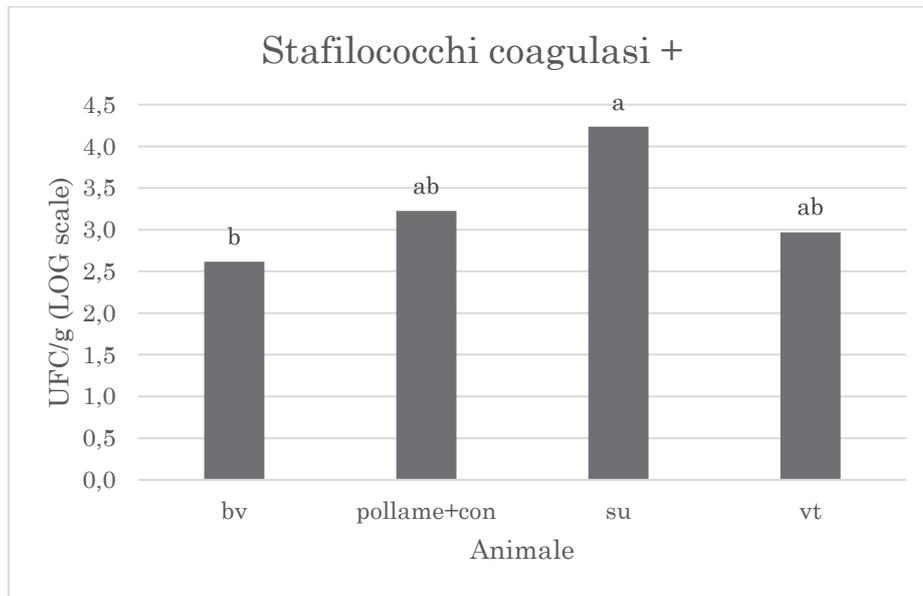
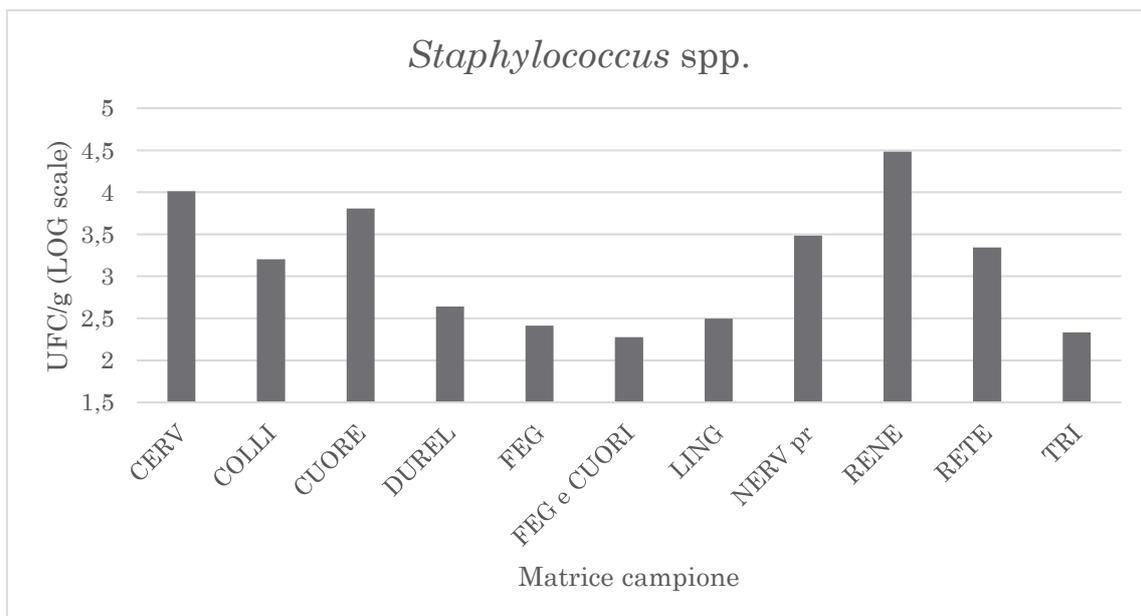


Grafico 5. Carica media da *Staphylococcus* spp. in base alla matrice dei campioni



Considerando l'analisi multivariata della Correlazione di Pearson ($p\text{-value}<0,001$), *Staphylococcus* spp. risultano direttamente correlati i sospetti *S. aureus* e viceversa per il 54,8% con $p=0,0000$.

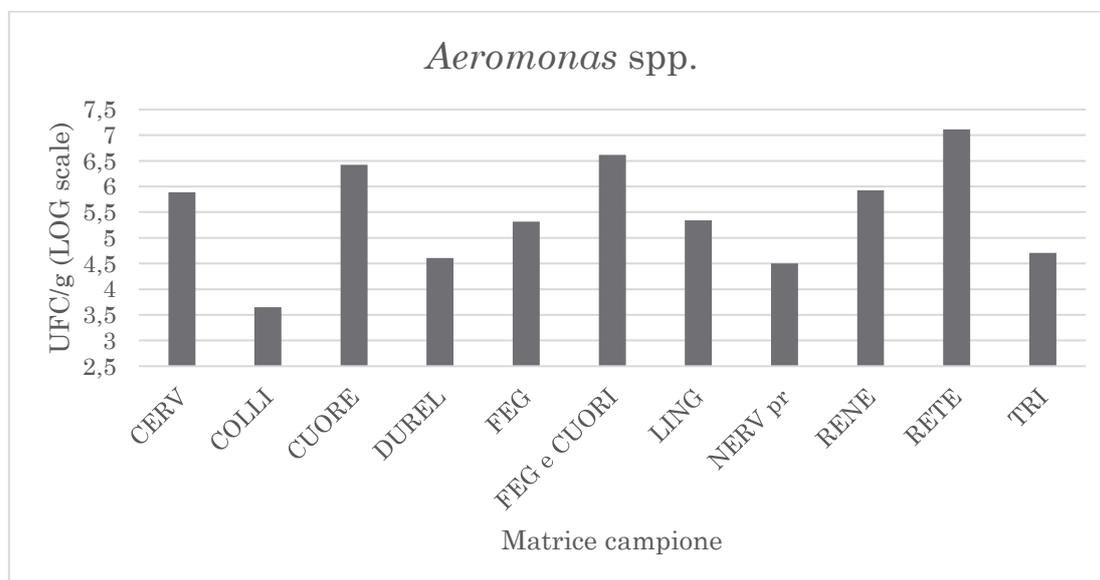
Aeromonas spp.

Per questi batteri alteranti sono state riscontrate delle differenze statisticamente significative per quanto concerne la matrice di campioni, con $p=0,045$; come mostrato in Tabella 20 e in Grafico 6 i campioni di rete sono risultati quelli maggiormente contaminati.

Tabella 20. Contaminazione da *Aeromonas* spp. in base al tipo di animale

Matrice campione	<i>Aeromonas</i> spp. medie (Log UFC/g) \pm Errore standard
Cervello	5,9 \pm 1,0
Colli	3,6 \pm 0,8
Cuore	6,4 \pm 0,5
Durelli	4,6 \pm 0,7
Fegato	5,3 \pm 0,3
Fegati e cuori	6,6 \pm 0,9
Lingua	5,3 \pm 0,5
Nervetti precotti	4,5 \pm 1,0
Rene	5,9 \pm 1,0
Rete	7,1 \pm 0,8
Trippa	4,7 \pm 0,5

Grafico 6. Contaminazione da *Aeromonas* spp. in base alla matrice dei campioni

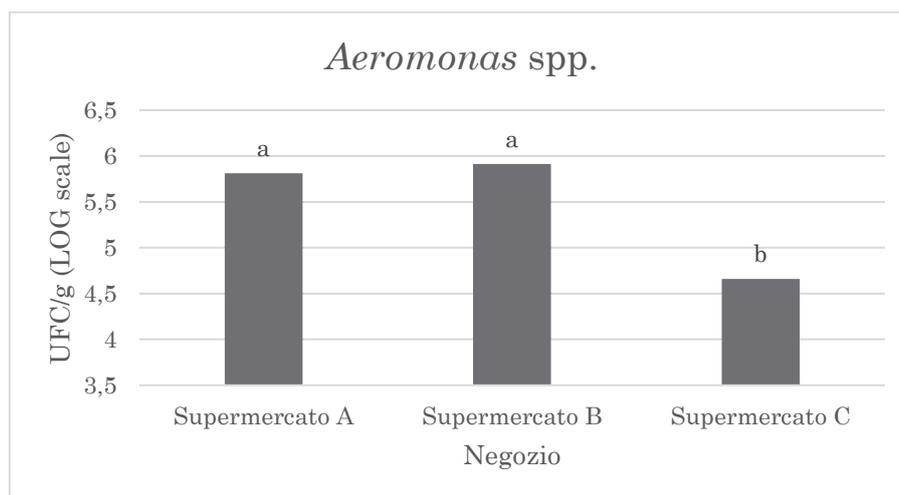


Sono state, inoltre, riscontrate delle differenze statisticamente significative per il negozio di prelievo, con $p=0,0278$ come mostrato in Tabella 21 e in Grafico 7: la contaminazione risulta nettamente inferiore per i campioni prelevati presso il Supermercato C.

Tabella 21. Cariche medie di *Aeromonas* spp. in base al negozio di prelievo

Negozio	<i>Aeromonas</i> spp. medie (Log UFC/g) \pm Errore standard
Supermercato A	5,8 \pm 0,4
Supermercato B	5,9 \pm 0,5
Supermercato C	4,7 \pm 0,3

Grafico 7. Contaminazione da *Aeromonas* spp. in base al negozio di prelievo



Considerando l'analisi multivariata della Correlazione di Pearson (p -value<0,001), *Aeromonas* spp. risultano direttamente correlati ai coliformi fecali per il 45,1% con $p=0,0004$ e a *Listeria* spp. quantitativa per il 45,6% con $p=0,0017$.

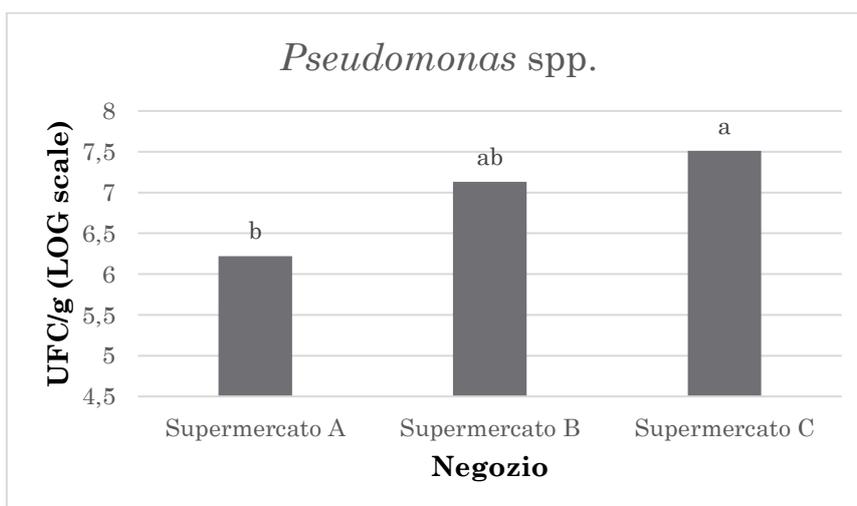
Pseudomonas spp.

Come per *Aeromonas* spp., anche per questi batteri alteranti sono state riscontrate delle differenze statisticamente significative considerando il negozio di prelievo dei campioni, con $p=0,0393$, come mostrato in Tabella 22 e in Grafico 8.

Tabella 22. Cariche medie di *Pseudomonas* spp. in base al negozio di prelievo

Negozio	<i>Pseudomonas</i> spp. medie (Log UFC/g) \pm Errore standard
Supermercato A	6,2 \pm 0,4
Supermercato B	7,1 \pm 0,5
Supermercato C	7,5 \pm 0,4

Grafico 8. Contaminazione da *Pseudomonas* spp. in base al negozio di prelievo



Sia per *Aeromonas* spp. che per *Pseudomonas* spp. sono stati effettuati test biochimici che hanno portato alla conferma dei risultati ottenuti, come mostrato in Tabella 23.

Tabella 23. Test biochimici per *Aeromonas* spp. e *Pseudomonas* spp.

Campione	Microrganismo	Ureasi	Indolo	L-lisina
910	<i>Aeromonas</i> spp.	-	+	-
912	<i>Aeromonas</i> spp.	-	+	-
915	<i>Aeromonas</i> spp.	-	+	-
923	<i>Aeromonas</i> spp.	-	+	-
938	<i>Aeromonas</i> spp.	-	+	-
921	<i>Pseudomonas</i> spp.	-	-	-
928	<i>Pseudomonas</i> spp.	-	-	-
929	<i>Pseudomonas</i> spp.	-	-	-
937	<i>Pseudomonas</i> spp.	-	-	-
938	<i>Pseudomonas</i> spp.	-	-	-

Considerando l'analisi multivariata della Correlazione di Pearson ($p\text{-value} < 0,001$), *Pseudomonas* spp. risultano direttamente correlati a Enterobacteriaceae totali per il 46,6% con $p=0,0003$.

Salmonella

Dalle analisi sono risultati sospetti di *Salmonella* spp. 12 campioni. I test biochimici effettuati (idrogeno solforato, indolo, ureasi, decarbossilazione della L-lisina) hanno invece dimostrato l'assenza, in quanto si tratta per tutti i ceppi di *Citrobacter* spp., (Tabella 24).

Tabella 24. Test biochimici per sospette *Salmonella*

Campione	H ₂ S	Indolo	Ureasi	L-lisina
918	+	-	-	-
919	+	-	-	-
923	+	-	-	-
926	+	-	-	-
927	+	-	-	-
932	+	-	-	-
937	+	-	-	-
941	+	-	-	-
942	+	-	-	-
943	+	-	-	-
954	+	-	-	-

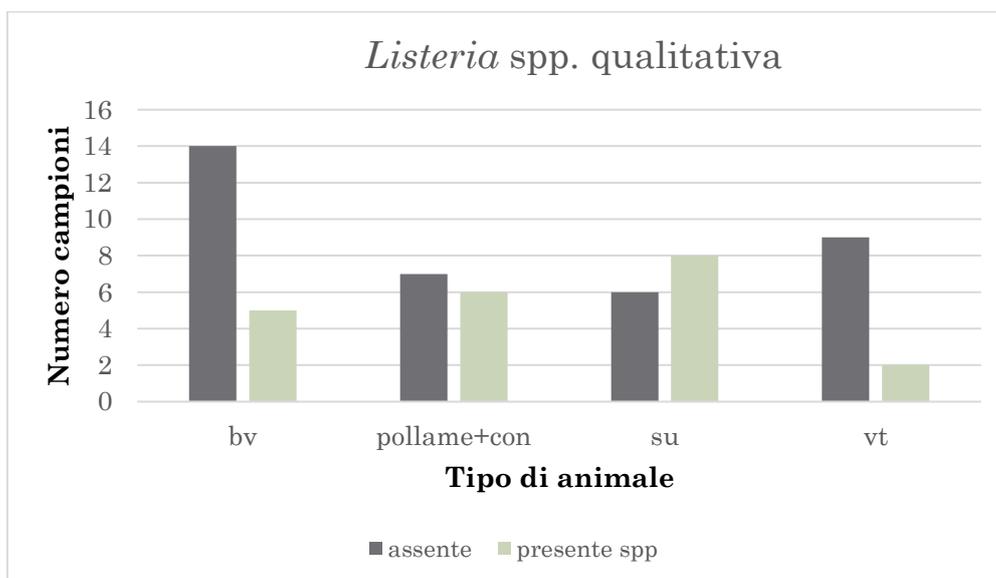
Listeria

Riguardo le analisi qualitative per *Listeria*, come mostrato in Tabella 25, 21 campioni sono risultati positivi per *Listeria* spp., e, anche se non sono state riscontrate delle differenze statisticamente significative dal test del Chi-quadro (con *p-value* <0,01), si è visto che il numero maggiore di campioni positivi è per frattaglie di maiale, come mostrato in Grafico 9. In nessun campione è stata riscontrata *L. monocytogenes*.

Tabella 25. Risultati dell'analisi qualitativa per *Listeria*

Tipologia di animale	<i>Listeria</i> spp.		
	Assente	Presente spp.	Totale complessivo
Bovino	14	5	19
Pollame+coniglio	7	6	13
Suino	6	8	14
Vitello	9	2	11
Totale complessivo	36	21	57

Grafico 9. Risultati dell'analisi qualitativa per *Listeria* spp. Bv=bovino, pollame+con=pollame più coniglio, su=suino, vt=vitello



Sempre applicando il test del Chi-quadro con $p\text{-value} < 0,01$, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative per quanto riguarda, oltre che l'effetto del tipo di animale, anche l'effetto negozio, il tipo di matrice e di presentazione dei campioni. Sono state, invece, riscontrate delle differenze, per quanto concerne il processamento, in quanto *Listeria* spp. è stata ritrovata solo su campioni crudi, come mostrato in Tabella 26.

Tabella 26. Test del chi-quadro ($p\text{-value} < 0,01$) per *Listeria* e processamento dei campioni

Processamento (cotto/crudo)	<i>Listeria</i>			
	Assente	Presente spp.	Totale complessivo	%
Cotto	10	0	10	0
Crudo	26	21	47	45
Totale complessivo	36	21	57	
			Differenza	-0,44681
			$p\text{-value}$ (bilaterale)	0,004

Considerando l'analisi multivariata della Correlazione di Pearson ($p\text{-value} < 0,001$), *Listeria* spp. risulta direttamente correlata ad *Aeromonas* spp. per il 47,570% con $p=0,0017$.

Determinazione del pH

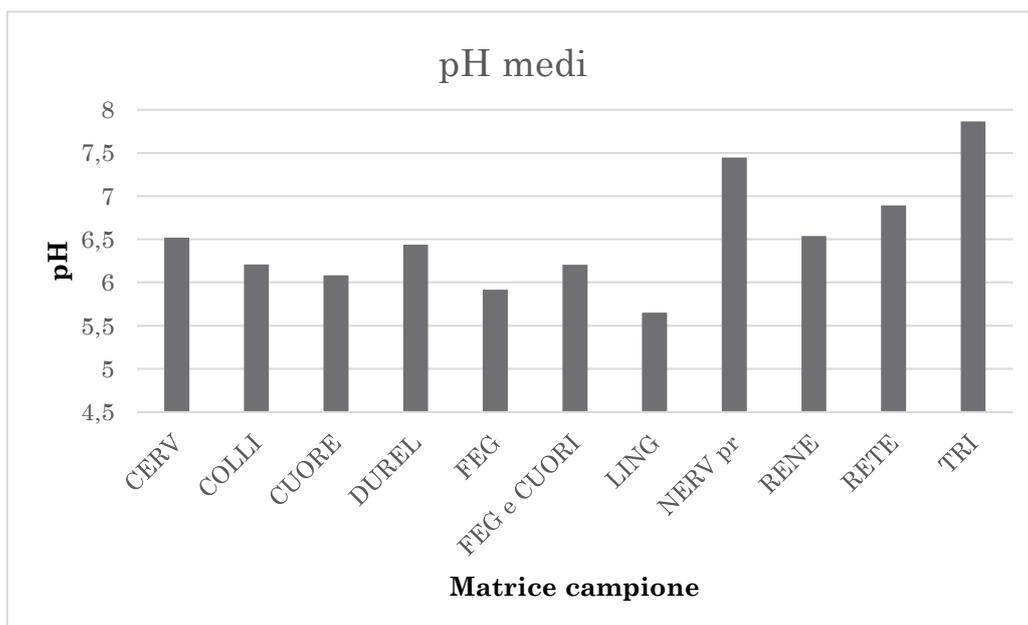
Per i valori di pH, tramite test ANOVA (p -value=0,05), sono risultate delle differenze statisticamente significative per quanto concerne la matrice dei campioni, con $p < 0,0001$; in Tabella 27 sono riportate le medie dei valori misurati per tipologia di campione.

Tabella 27. Valori medi di pH in base alla tipologia di matrice

Matrice campione	pH medi \pm Errore standard
Cervello	6,52 \pm 0,25
Colli	6,21 \pm 0,20
Cuore	6,08 \pm 0,12
Durelli	6,44 \pm 0,17
Fegato	5,92 \pm 0,09
Fegati e cuori	6,21 \pm 0,24
Lingua	5,65 \pm 0,14
Nervetti precotti	7,45 \pm 0,25
Rene	6,54 \pm 0,25
Rete	6,89 \pm 0,21
Trippa	7,86 \pm 0,13

Come si evince dal Grafico 10, i prodotti con pH più elevato sono la trippa (in cui sono compresi anche i centopelli) e i nervetti precotti.

Grafico 10. Valori medi di pH in base alla tipologia di matrice

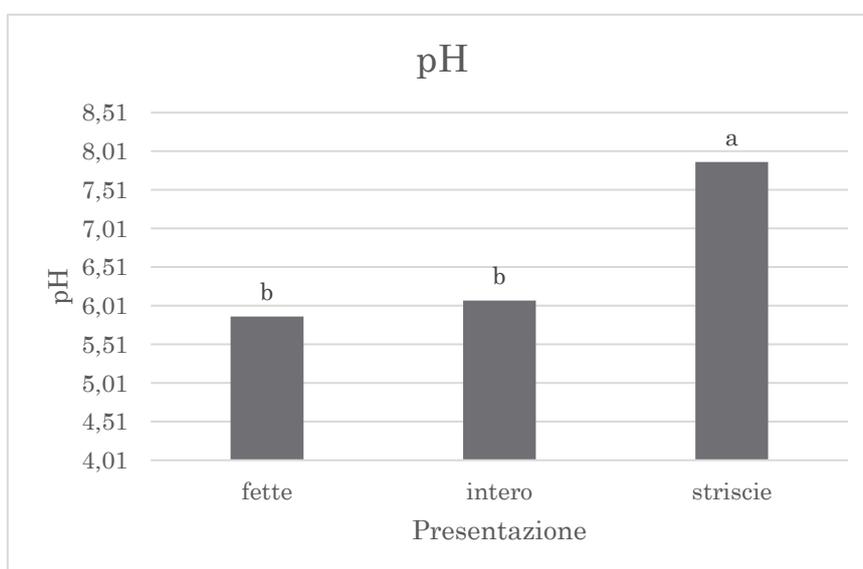


Sono state, rilevate, delle differenze statisticamente significative del pH sulla base dalla presentazione dei campioni ($p < 0,0001$): come risulta da Tabella 28 e Grafico 11, hanno valori più alti i prodotti in strisce (ovvero trippa e centopelli).

Tabella 28. Valori medi di pH dei campioni in base alla loro presentazione

Presentazione	pH medi \pm Errore standard
Fette	5,87 \pm 0,17
Intero	6,08 \pm 0,10
Strisce	7,87 \pm 0,21

Grafico 11. Valori medi di pH dei campioni in base alla loro presentazione



8. Considerazioni

Dai dati evinti dalla bibliografia risulta che poche sono state le ricerche effettuate specificamente nel campo della microbiologia delle frattaglie e, inoltre, quelle approntate, si sono soffermate su poche tipologie (in particolar modo fegato e cuore), e su analisi fatte su prodotti ottenuti in fase di macellazione e che, quindi, non tengono conto del tempo intercorso fino all'arrivo al punto vendita, rendendo difficile ad oggi un confronto dei dati ottenuti. I lavori, soprattutto i più recenti, inoltre, sono più che altro incentrati sulla ricerca dei patogeni e non dei batteri alteranti. Per quanto concerne i valori di pH dei campioni, sono risultati leggermente inferiori, ma comunque in linea a quelli riscontrati da Guerrero-Lagarreta (2011) Kang e coll. (2014) e Catellani (2017). I campioni che hanno pH più elevato sono trippa e centopelli a causa del trattamento di sbiancamento con la soda subito. Per la maggior parte dei parametri microbiologici considerati, il livello di contaminazione da microrganismi alteranti rilevato in sede di analisi, specialmente Gram negativi (Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp....), ma anche Gram positivi come i batteri lattici, risulta superiore rispetto a quanto desunto dalle fonti. Oltre a queste, la Direzione Sanità della Regione Piemonte (2011) ha raccolto, in una procedura, i valori guida esistenti (in particolare francesi) per le frattaglie nelle analisi microbiologiche, corredando il tutto con i valori legislativi quando presenti, che però normalmente fanno riferimento alle carcasse (Tabella 31).

Per le frattaglie avicole, come mostrato in Tabella 29, i valori medi per CMT e coliformi fecali sono risultati, rispetto a quanto riportato da Álvarez-Astorga e coll. (2002), in linea per i coliformi fecali e ben più elevati per la CMT. In Tabella 30 è mostrato come alcuni campioni siano risultati non accettabili secondo le linee guida di Tabella 31 per CMT ed Enterobacteriaceae totali. Per tutti i prodotti avicoli analizzati, la maggior parte della contaminazione riscontrata è rappresentata da alteranti, probabilmente derivati dall'ambiente di macellazione, di lavorazione, di stoccaggio o da utensili, quali *Aeromonas* spp. (5,12 log UFC/g) e *Pseudomonas* spp. (6,96 log UFC/g).

Tabella 29. Confronto con i valori bibliografici per fegati e cuori avicoli log UFC/g

Matrice	Microrganismo	Dati di laboratorio	Álvarez-Astorga e coll. (2002)
Fegati e cuori	CMT	7,79	5,56
	Coliformi fecali	5,27	4,62

Tabella 30. Confronto dei valori con le linee guida di Tabella 31 per frattaglie avicole.
Campioni: sodd=soddisfacenti, acc=accettabili; non sodd=non soddisfacente

Microrganismo	Matrice	N. campioni	Carica media	Sodd.	Acc.	Non Sodd.
CMT	Fegati e cuori	2	7,8	0	1	1
	Fegati	2	7,4	1	0	1
	Durelli	4	7,1	2	0	2
	Cuore	1	5,8	1	0	0
	Colli	3	7,0	1	0	2
Enterobacteriaceae	Fegati e cuori	2	6,1	0	0	2
	Fegati	2	4,2	0	1	1
	Durelli	4	4,3	1	1	2
	Cuore	1	2,5	1	0	0
	Colli	3	4,7	0	1	2

Tabella 31. Valori guida consigliati per le frattaglie (Direzione Sanità Regione Piemonte 2011)

9.4 CARNI SEPARATE MECCANICAMENTE (CSM) - FRATTAGLIE - GELATINA E COLLAGENE								
PARAMETRI	METODO	NORMA DI RIFERIMENTO [#]	VALORI GUIDA CONSIGLIATI (ufc/g)					NOTE
			Sodd.	Acc.	Non Sodd.	Potenz. dannoso	Riferimenti	
Microorganismi mesofili aerobi	ISO 4833		<5x10 ⁵ (n=5, c=2)	5x10 ⁵ ≤ x <5x10 ⁶ (n=5, c=2)	≥5x10 ⁶ (n=5, c=2)		Reg.CE 2073/05 e s.m.i.	Questi criteri si applicano alle carni separate meccanicamente (CSM) prodotte con le tecniche di cui all'allegato III, sezione V, capitolo III, paragrafo 3, del Reg. CE n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio. Frattaglie: prelievo effettuato in profondità, oltre la superficie cauterizzata.
			<10 ⁷	10 ⁵ ≤ x ≤ 10 ⁸	>10 ⁸		FCD (2009)	
<i>E.coli</i> β-galucuronidasi positivi	ISO 16649-2		<5x10 ⁴ (n=5, c=2)	5x10 ⁴ ≤ x <5x10 ⁵ (n=5, c=2)	≥5x10 ⁵ (n=5, c=2)		Reg.CE 2073/05 e s.m.i.	Carni separate meccanicamente.
Enterobacteriaceae	ISO 21528-2		≤10 ⁵	10 ⁵ ≤ x ≤ 10 ⁶	>10 ⁶		FCD (2009)	Frattaglie.
Stafilococchi coagulasi positivi	ISO 6888-1		<10 ²	10 ² ≤ x <10 ⁴	≥10 ⁴	≥10 ⁵ e SET(+)	ANZFA (2001); ICMSF Circ E-R N°8/1992	Gelatina e collagene.
<i>Listeria monocytogenes</i>	O.M. 07/12/1993	m=11 MPN/g, M=110 MPN/g (n=3, c=2) O.M. 7/12/1993	<110 MPN/g			>110 MPN/g		Se il campione presenta la dicitura "da consumarsi previa cottura" o è destinato per sua natura ad essere consumato previa cottura, <i>L. monocytogenes</i> va numerata con metodo MPN su 5 u.c., come previsto dall'O.M. 7/12/93.
<i>Salmonella</i> spp.	ISO 6579	Assente in 10 g (n=5, c=0) Reg.CE 2073/05 e s.m.i.	Assente			Presente	Reg.CE 2073/05 e s.m.i.	Carni separate meccanicamente.
		Assente in 25 g (n=5, c=0) Reg.CE 2073/05 e s.m.i.	Assente				Reg.CE 2073/05 e s.m.i.	Gelatina e collagene.
		Assente in 25 g (n=5, c=0) L.283/1962, art.5 C.P. art. 444	Assente					Tenere conto della natura dell'alimento, dell'uso abituale (carne da consumarsi cruda o poco cotta), del rischio di contaminazioni crociate, della popolazione esposta e delle informazioni messe a disposizione del consumatore.

Per le frattaglie suine, in Tabella 32 è proposto il confronto con i valori guida di Tabella 31: i campioni di rete risultano essere quelli con la maggiore carica sia per la CMT che per le Enterobacteriaceae e solo 1 su 4 è accettabile per la CMT.

Tabella 32. Confronto dei valori con le linee guida di Tabella 31 per frattaglie di suino.
Campioni: sodd=soddisfacenti, acc=accettabili; non sodd=non soddisfacente

Microrganismo	Matrice	N. campioni	Carica media	Sodd.	Acc.	Non Sodd.
CMT	Fegato	4	7,7	0	3	1
	Cuore	5	7,4	2	2	1
	Lingua	2	7,7	0	1	1
	Rete	3	9,1	0	1	2
Enterobacteriaceae	Fegato	4	5,2	2	2	0
	Cuore	5	5,3	0	1	4
	Lingua	2	6,4	0	1	1
	Rete	3	6,8	0	0	3

Anche per i campioni di suino, come mostrato in Tabella 33, i valori ottenuti per la CMT sia di fegato che cuore si discostano molto da quelli ottenuti da Hanna e coll. (1982), meno da quelli di Sinnel e coll. (1984); occorre, comunque sottolineare ulteriormente che tali valori sono ottenuti da campioni prelevati al macello e non presso i punti vendita. Come per le frattaglie avicole, la maggior parte della contaminazione è data da *Aeromonas* spp. (5,24 log UFC/g) *Pseudomonas* spp. (7,04 log UFC/g).

Tabella 33. Confronto con i valori bibliografici per fegato e cuore suino log UFC/g

Matrice	Microrganismo	Dati da laboratorio	Hanna <i>et al.</i> (1982)	Sinnel <i>et al.</i> (1984)
Fegato	CMT	7,72	2,47	6,49
	Enterobacteriaceae	5,20		4,78
Cuore	CMT	7,44	1,52	6,45
	Enterobacteriaceae	5,23		5,33

Per le frattaglie bovine, il confronto tra i valori ottenuti in laboratorio e i valori guida in Tabella 31 è proposto in Tabella 34, di cui si sottolinea che CMT ed Enterobacteriaceae più elevate medi sono del rene e che, ad esempio, 6 campioni su 7 di fegato risultano non accettabili per le Enterobacteriaceae.

Tabella 34. Confronto dei valori con le linee guida di Tabella 31 per frattaglie di bovino.
Campioni: sodd=soddisfacenti, acc=accettabili; non sodd=non soddisfacente

Microrganismo	Matrice	N. campioni	Carica media	Sodd.	Acc.	Non Sodd.
CMT	Fegato	7	7,6	1	4	2
	Cuore	2	8,6	0	1	1
	Lingua	5	6,9	3	2	0
	Rene	3	8,2	0	1	1
	Trippa	8	6,9	5	0	3
	Cervello	2	7,7	0	1	1
	Polmone	1	7,6	0	1	0
	Nervetti crudi	1	6,5	1	0	0
Enterobacteriaceae	Fegato	7	4,8	0	1	6
	Cuore	2	5,0	0	0	2
	Lingua	5	3,9	5	0	0
	Rene	3	5,6	0	2	0
	Trippa	8	4,8	6	2	0
	Cervello	2	4,8	1	1	0
	Polmone	1	2,8	1	0	0
	Nervetti crudi	1	5,0	1	0	0

Per le frattaglie di bovino, le fonti tendono ad essere un po' più ampie: come mostrato in Tabella 35, Hanna e coll. (1982) e Sinsel e coll. (1984) hanno ottenuto dei valori più bassi di quelli riscontrati in laboratorio per la CMT e in linea per le Enterobacteriaceae. Nella loro ricerca, Cohen e coll. (2006) distinguono specificamente le analisi di campioni prelevato in macello, nelle macellerie locali e nei supermercati: in questi ultimi, per il fegato i valori si dimostrano in linea con quanto riscontrato in laboratorio, mentre per il cuore sono nettamente inferiori. Pure quelli evinti dal lavoro di Selvan e coll. (2007) sono inferiori a quelli ottenuti in laboratorio, eccetto che per i coliformi fecali. La maggior frazione della contaminazione, per i prodotti crudi e costituita da *Pseudomonas* spp. (7,07 log UFC/g), mentre per quelli cotti sia da *Pseudomonas* spp. (6,96 log UFC/g) e *Streptococcus* spp. (5,97 log UFC/g), probabilmente da contaminazione dopo il trattamento termico.

Tabella 35. Confronto con i valori bibliografici per fegato, cuore e trippa di bovino

Matrice	Microrganismo	Dati da laboratorio	Hanna <i>et al.</i> (1982)	Sinnel <i>et al.</i> (1984)	Cohen <i>et al.</i> (2006)	Selvan <i>et al.</i> (2007)
Fegato	CMT	7,76	2,65		7,7	5,53
	Coliformi fecali	4,45			4,0	5,04
	<i>Staphylococcus spp.</i>	2,61			2,2	5,26
Cuore	CMT	8,64	2,10	7,16	3,9	5,46
	Enterobacteriaceae	4,98		5,68		
	Coliformi fecali	4,22			1,9	4,98
	<i>Staphylococcus spp.</i>	3,77			2,0	5,24
Trippa	CMT	6,98		6,94		
	Enterobacteriaceae	4,27		5,15		

I dati ottenuti dalle analisi per la CMT media della lingua (bovino: 6,9 log UFC/g; suino: 7,7 log UFC/g) e per il rene bovino (8,2 log UFC/g) risultano ugualmente più alti rispetto a quelli bibliografici come mostrato in Tabella 36 e accettabili rispetto ai valori guida di Tabella 31, eccetto che per il rene bovino.

Tabella 36. Conta microbica totale di frattaglie (ICMSF 2005)

Species	Liver	Heart	Kidney	Diaphragm	Tongue	Tail	Reference
Beef	4.35 ^a	3.72 ^a	3.73 ^a	6.46 ^a	5.99 ^a	–	1
	5.51	4.58	–	4.86	4.97	4.45	2
	4.55	4.61	4.72	3.75	4.98	4.86	2
	2.50	2.28	2.77	–	–	–	3
	3.36	–	–	–	3.69	–	4
	3.69	3.92	3.51	–	4.20	–	5a
	3.58	3.85	3.66	–	3.61	–	5b
	2.61	3.13	2.85	–	2.32	–	5c
Sheep	4.62 ^a	4.92 ^a	–	5.46 ^a	6.38 ^a	–	1
	4.23	3.05	3.29	–	–	–	3
	3.18	–	–	–	4.28	–	4
Pig	3.28	3.04	3.80	–	–	–	3
	4.04	–	–	–	5.76	–	4
	4.78	–	–	–	–	–	6
	3.28	–	–	–	–	–	5a
	3.27	–	–	–	–	–	5b
	1.69	–	–	–	–	–	5c

^alog₁₀ cfu/g.

1. Samples excised, incubated at 25°C (Sheridan and Lynch, 1988).
2. Swab samples, incubated at 22°C (Patterson and Gibbs, 1979).
3. Samples excised, incubated at 25°C (Hanna *et al.*, 1982).
4. Samples excised, incubated at 25°C (Vanderzant *et al.*, 1985).
5. Swab samples, incubated at 37°C (5a), at 20°C (5b), at 7°C (5c), (Oblinger *et al.*, 1982).
6. Samples excised, incubated at 22°C (Gardner, 1971).

Nella maggior parte dei casi, le conte ottenute risultano molto più elevate di quelle evinte dalle fonti, in particolar modo per la conta microbica totale, che risulta molto più elevata, in particolare 22 campioni su 57 superano il valore guida di 8 log UFC/g (Tabella 31), anche se

non c'è una tipologia di prodotti contaminati che prevale sulle altre. Per i prodotti cotti come trippa, centopelli e nervetti, il valore particolarmente elevato è probabilmente dovuto ad una contaminazione crociata dopo la cottura, in fase di confezionamento, probabilmente per scarsa igiene degli ambienti, degli operatori e delle attrezzature preposte. Elevato è anche il valore degli Stafilococchi, indice di contaminazione secondaria e dei coliformi fecali, indicatori di contaminazione fecale, derivabile sia da errate operazioni in fase di macellazione che da mancata igiene di attrezzi e scarsa igiene del personale che manipola i prodotti. Inoltre, concausa di questi valori può essere imputata al mancato rispetto della catena del freddo lungo tutta la filiera. Non sono, perciò, confortanti i risultati ottenuti perché spia di un non sufficiente controllo di qualche fase produttiva: della catena del freddo, delle procedure di macellazione, dell'igiene di ambienti, attrezzature e operatori che manipolano le frattaglie. Si deve, comunque, tener conto che si tratta, per la maggior parte di prodotti destinati a delle cotture molto prolungate (cuore, lingua, trippe, nervetti, durrelli...), che permettono, quindi, un abbattimento della carica microbica e anche il raggiungimento della consistenza ottimale, dato che molte frattaglie, come cuore e durrelli hanno consistenza assai dura. Potrebbe non essere, invece, adeguato il processo termico cui si sottopone il fegato e i prodotti già venduti a fette, che spesso vengono solo "scottati".

Per quanto concerne i patogeni, durante le prove in laboratorio, in nessuno dei campioni sono stati riscontrati né *Salmonella* né *Listeria monocytogenes*, che sono, invece, sovente riscontrate nei campioni di frattaglie. Secondo Kuan e coll. (2013) *L. monocytogenes* è stata trovata nel 26,29% dei campioni (fegato: 25,00%, ventriglio: 33,33% e cuore di pollo: 20,83%); per Kuan, Wong e coll (2013) è risultata nel 33,33% dei campioni costituiti da frattaglie di bovino (fegato: 25,00%, polmone: 50,00%, intestino: 22,22%, trippa: 46,67%, e animelle: 0%). *Salmonella*, invece, nello studio di Sinnel e coll. (1983) è stata trovata nel 56,6% dei campioni (polmone, cuore, fegato, ruminante); nel lavoro di Akkaya e coll. (2012) sulle frattaglie bovine, è stata individuata nel 16% dei fegati, nel 4% di trippe, cervelli e reni. Per frattaglie avicole, secondo Sodagari e coll. (2015) la presenza di *Salmonella* è stata constatata nel 21,6% di fegati, 14,1% di cuori, 8,3% nei ventrigli. Positività alla *Salmonella* nelle frattaglie è stata riscontrata da Tafida e coll. (2013). Il fatto di non aver rilevato i due patogeni nelle analisi di laboratorio approntate può essere visto come positivo dal punto di vista della sicurezza alimentare, segno che, nonostante gli alti valori degli alteranti, gli operatori della filiera hanno lavorato bene.

Saranno necessari ulteriori studi per ottenere un confronto adeguato e significativo, considerando più tipologie di frattaglie e considerando anche patogeni come *Campylobacter* e *Yersinia enterocolitica*.

9. Conclusioni

Il 38,6% dei campioni analizzati è risultato per la conta microbica totale oltre 10^8 log UFC/g e il 15,8% oltre 10^6 log UFC/g, valori evinti dalle linee guida della Direzione Sanità della Regione Piemonte come accettabili, spia, probabilmente, di controllo non adeguato delle condizioni igieniche. Gran parte delle frattaglie, però, per raggiungere una consistenza tale da poter essere mangiate, devono subire cotture molto prolungate, che, oltre che una modificazione sostanziale di consistenza, porta anche ad un abbattimento della carica microbica del prodotto. Nonostante ciò, si dovrà comunque puntare ad un'implementazione delle pratiche igieniche lungo tutta la filiera produttiva, perché, frattaglie, come ad esempio il fegato, subiscono un trattamento termico poco spinto e che potrebbe quindi portare ad un abbattimento poco considerevole della carica microbica dell'alimento: l'implementazione delle GMP per l'igiene dovrà partire dai locali di macellazione e mezzi di trasporto, fino al personale, agli utensili e agli strumenti sia al macello che presso il punto vendita, con miglioramento, pure del controllo della catena del freddo, per rallentare l'aumento della contaminazione microbica presente.

Nonostante le conte, spesso elevate per gli alteranti (in particolare *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp.), molto positivo è il fatto di non aver riscontrato patogeni come *Salmonella*, e *Listeria monocytogenes*, che, invece, le fonti bibliografiche riportano come patogeni spesso ritrovati su frattaglie.

Dal punto legislativo ci sono carenze, più che altro dettate dal momento storico (BSE negli anni '90) in quanto non esistono dei limiti microbiologici (sia per patogeni che per alteranti) specificamente relativi alle frattaglie, ma sono riferiti a carcasse o a carni fresche. Auspicio per il futuro è quello di un'implementazione della legislazione, rispetto alle linee guida esistenti, in modo da poter dare un riferimento definito agli operatori del settore, visto il seppur lieve, ma comunque presente, aumento del consumo di questi prodotti, un tempo considerati come scarti.

I risultati ottenuti da queste analisi microbiologiche di frattaglie regolarmente commercializzate hanno permesso di ampliare i dati disponibili relativi a tale tematica, in quanto, le fonti bibliografiche presenti sono scarse e si concentrano sull'analisi di campioni prelevati presso i macelli, non tenendo conto del tempo e delle manipolazioni che un prodotto acquistato in un punto vendita subisce. Inoltre, la maggior parte degli studi è incentrata su pochissime categorie di campioni, come fegato e cuore. Sarà, dunque, necessario approntare ulteriori analisi così da poter ampliare il ventaglio di dati, per poter ottenere dei confronti più significativi. La sfida,

dovrà essere, quindi, quella di approfondire la microbiologia dei prodotti venduti al dettaglio, soffermandosi anche

su tipologie meno diffuse, ma che, grazie all'odierna riscoperta delle materie prime "povere", stanno ritornando in auge.

10. Bibliografia

1. Akkaya, L., Atabay H. I., Gök V. and Yaman H. (2012). Prevalence of Salmonella in Edible Offal in Afyonkarahisar Province, Turkey. *Afyonkarahisar İlindeki Yenebilir Sakatatlarda Salmonella'nın Prevalansı*, 18(4): 613-616.
2. Álvarez-Astorga M., Capita R., Alonso-Calleja C., B. Moreno, del M. and García-Fernández C. (2002). Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Science*, 62(1): 45-50.
3. APAT, I. (2003b). Metodi per la determinazione di microorganismi indicatori di inquinamento e di patogeni: Aeromonas spp. In *Metodi analitici per le acque*, 921-925, ed. Anonymous, Roma, Italy.
4. Armitage, N. H. (1997). Use of predictive microbiology in meat hygiene regulatory activity. *International Journal of Food Microbiology*, 36(2): 103-109.
5. Blagojevic, B., Dadios N., Reinmann K., Guitian J. and Stärk K. D. C. (2015). Green offal inspection of cattle, small ruminants and pigs in the United Kingdom: Impact assessment of changes in the inspection protocol on likelihood of detection of selected hazards. *Research in Veterinary Science*, 100: 31-38.
6. Bonadonna L. and Ottaviani M. (2007). Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi microbiologici. *Rapporti ISTISAN* 05.
7. Catellani P. (2017). *Ispezione sanitaria delle frattaglie* (in stampa).
8. Cohen, N. (2006). The bacterial quality of red meat and offal in Casablanca (Morocco). *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(10): 979.
9. Colavita, G. and A. Armani. (2008). *Igiene e tecnologie degli alimenti di origine animale*. Milano: PVI Point vétérinaire Italie.

10. De Felip G., (2001). *Recenti sviluppi di igiene e microbiologia degli alimenti*. Milano, Tecniche nuove.
11. Galetta P., Busani L., Dionisi A. M., Filetici E., Ricci A., Caprioli A., Luzzi I. and Graziani C. (2005). Infezioni da *Salmonella*: diagnostica, epidemiologia e sorveglianza *Rapporti ISTISAN 27*.
12. Gardner, G. A. (1971). A note on the aerobic microflora of fresh and frozen porcine liver stored at 5°C. *International Journal of Food Science & Technology* 6(3), 225-231.
13. Ghinelli, I. (1975). *Le carni conservate. Volume primo, Parte generale: Principi di igiene e di tecnica della produzione della trasformazione e della conservazione degli alimenti*. 2. ed. La Nazionale, Parma.
14. Ghinelli, I. (1977). *Le carni conservate. Volume secondo, macelli e macellazione, laboratori sezionamento e confezionamento della carne*. Ed. La Nazionale, Parma.
15. Hanna M. O., Smith G. C., Savell J. W., McKeith F. K. and Vanderzant. C. (1982). Microbial Flora of Livers, Kidneys and Hearts from Beef, Pork and Lamb: Effects of Refrigeration, Freezing and Thawing. *Journal of Food Protection*, 45(1): 63-73.
16. Kale M. C., Aral Y., Aydın E., Cevger Y., Sakarya E. and Güloğlu S. C. (2011). Determination of by-product economic values for slaughtered cattle and sheep. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(4): 551-556.
17. Kang G., Seong P., Moon P, Cho S., Ham H., Park K., Kang S. and Park B. (2014). Distribution Channel and Microbial Characteristics of Pig By-products in Korea. *Korean journal for food science of animal resources*, 34(6): 792-798.
18. ICMSF Kluwer Academic, (2005). *Microrganism in foods*, 2nd edition.
19. Kuan C. H., Goh S. G., Loo Y. Y., Chang W. S., Lye Y. L., Puspanadan S., Tang J. Y. H., Nakaguchi Y., Nishibuchi M, Mahyudin N. A. and Radu S. (2013). Prevalence and

- quantification of *Listeria monocytogenes* in chicken offal at the retail level in Malaysia. *Poultry science*, 92(6): 1664-1669.
20. Kuan C. H., Wong W. C., Pui C. F., Mahyudin N. A., Tang J. Y. H., Nishibuchi M. and Radu S. (2014). Prevalence and quantification of *Listeria monocytogenes* in beef offal at retail level in Selangor, Malaysia. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4): 1169-1172.
 21. Montemurro F., Martino M. E., De Pasquale F., Balzan S., Cardazzo B, Novelli E. and Fasolato L (2011). Isolation and genotyping of *Aeromonas* spp. in ready-to-eat foods. Preliminary results. *Italian Journal of Food Safety*, 1(2): 39-42.
 22. Nollet Leo M.L. and Toldrá F. (2011). Introduction Offal Meat: Definitions, Regions, Cultures, and Generalities. In *Handbook of analysis of edible animal by-products*, CRC Press.
 23. Patterson J. T. and Gibbs. P. A. (1979). Vacuum-packaging of bovine edible offal. *Meat Science*, 3(3): 209-222.
 24. Piergiovanni L. and Limbo S. (2010). Food packaging: materiali, tecnologie e qualità degli alimenti. Milano, Springer.
 25. Direzione Sanità della Regione Piemonte. (2011) *Linee guida per l'analisi del rischio nel campo della microbiologia degli alimenti. Progetto regionale "Analisi del rischio microbiologico legato al consumo di alimenti finalizzato alla riduzione dei costi analitici"*. n.780 del 18 ottobre 2011.
 26. Scanziani, E., S. Stella and G. Ghisleni. (2008). *Manuale di ispezione e controllo delle carni*. Milano: CEA.
 27. Schira, R. (2008). *Il libro delle frattaglie: storia, scienza e cucina*. Ponte alle grazie.
 28. Selvan P., Mendiratta S. K., Porteen K., Bhilegaonkar K. N. (2007). Effects of lactic acid on quality of buffalo offals. *Internet Journal of food safety*, 9: 29-36

29. Shelef, L. A. (1975). Microbial spoilage of fresh refrigerated beef liver. *The Journal of Applied Bacteriology*, 39(3): 273-280.
30. Sinell H-J., Klingbeil H. and Benner. M. (1984). Microflora of Edible Offal with Particular Reference to Salmonella. *Journal of Food Protection*, 47(6): 481-484.
31. Sodagari H. R., Mashak Z. and Ghadimianazar A. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella serotypes isolated from retail chicken meat and giblets in Iran. *Journal of infection in developing countries*, 9(5): 463.
32. Tafida S. Y., Kabir J., Kwaga J. K. P., Bello M., Umoh V. J., Yakubu S. E., Nok A. J. and Hendriksen R. (2013). Occurrence of Salmonella in retail beef and related meat products in Zaria, Nigeria. *Food Control*, 32(1): 119-124.
33. Terry C. A., Knapp R. H., Edwards J. W., Mies W. L., Savell J. W. and Cross H. R. (1990). Yields of by-products from different cattle types. *Journal of Animal Science*, 68(12): 4200-4205.
34. Tiecco, G. (2001). *Igiene e tecnologia alimentare*. 2. ed. Bologna: Calderini Edagricole.
35. Toldrá, F., M. -. Aristoy, L. Mora and M. Reig. (2012). Innovations in value-addition of edible meat by-products. *Meat Science*, 92(3): 290-296.
36. Toldrá, F., L. Mora and M. Reig. (2016a). New insights into meat by-product utilization. *Meat Science*, 120: 54-59.
37. Zambonelli C. (1987). *Microbiologia applicata alle produzioni animali*. Bologna: Edagricole.
38. Immagine fegato di Piacenza www.piacenzantica.it (link verificato in data 13/09/2017).
39. Regolamento (CE) n. 199/2001 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 maggio 2001 “Disposizioni per la prevenzione, il controllo e l’eradicazione di talune encefalopatie spongiformi trasmissibili”. Gazzetta ufficiale dell’Unione Europea, 31 maggio 2001, L 147.

40. Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 “*Norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale*”. Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea, 30 aprile 2004, L139.
41. Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 “*Criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari*”. Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea, 22 dicembre 2005, L 338.
42. Regolamento (CE) n. 543/2008 della Commissione del 16 giugno 2008 “*Modalità di applicazione del Regolamento (CE) n. 1234/2007 del Consiglio per quanto riguarda le norme di commercializzazione per le carni di pollame*”. Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea, 17 agosto 2008, L157.

Ringraziamenti

Un ringraziamento profondo va alla mia famiglia che mi ha sempre sostenuto moralmente e affettuosamente nelle mie scelte e nelle mie difficoltà, sia i miei genitori che i miei fratelli Alberto, Daniela e Valentina. Un grazie infinito anche a mio cognato Loris e a Serafino per il supporto tecnico-logistico.

Un ringraziamento doveroso al “Mio Alberto”, perché ci teneva, quasi più dei miei genitori, che arrivassi fin qui e non mi ha mai fatto mancare il suo appoggio.

Alle mie coinquiline Anna, Lisa e Nicole, un grazie, perché mi hanno aiutato nei momenti difficili quando ero lontano da casa e perché mi hanno regalato tanti sorrisi e risate e bei ricordi. Grazie alle mie H-G perché anche se ci vediamo poco, è come se ci vedessimo sempre. Speciale plauso va ad Anna Z. per l'aiuto a trasportare i campioni.

Grazie tantissime alle mie compagne di viaggio di questi due anni, Elisa, Francesca e Chiara, per le risate che riuscivamo a farci anche nei momenti più seri e tristi e per gli Ape strepitosi.

Infine un caloroso grazie e un abbraccio immenso a Pia, che mi ha sempre trattata come se fossi una di famiglia.