



Valutazione della qualità igienico-sanitaria del pesce azzurro pescato nel golfo di Napoli

Università degli studi di Napoli Federico II
Dipartimento di Scienze Zootecniche ed Ispezione Alimenti Napoli

Con il contributo della Provincia di Napoli”

Questa iniziativa è contro il “sistema” della camorra



Valutazione della qualità igienico-sanitaria del pesce azzurro pescato nel golfo di Napoli

di A. Anastasio[°], R. Marrone[°], M. Panzardi[°], G. Palma*

[°]Università di Napoli

*Direttore del Mercato Ittico all'Ingrosso di Pozzuoli

Università degli studi di Napoli Federico II
Dipartimento di Scienze Zootecniche ed Ispezione Alimenti Napoli

Con il contributo della Provincia di Napoli

Questa iniziativa è contro il "sistema" della camorra

Valutazione della qualità igienico-sanitaria del pesce azzurro pescato nel golfo di Napoli

Gli agenti chimici o biologici in grado di minacciare la sicurezza degli alimenti sono molteplici ed estremamente complessi i meccanismi attraverso i quali essi possono agire. Data la natura interrelata della produzione alimentare, una politica efficace di sicurezza alimentare non può prescindere dall'attuazione di sistemi di valutazione e monitoraggio dei rischi e di controllo che devono necessariamente cominciare dalla produzione primaria, ed, attraverso l'eventuale trasformazione, coinvolgere i diversi livelli della filiera.

I prodotti della pesca rappresentano una delle principali fonti di approvvigionamento proteico a livello mondiale. In Italia ed in Campania in particolare, le attività legate alla pesca ed alla piccola pesca in particolare, hanno avuto una notevole importanza per lo sviluppo sociale, culturale ed occupazionale. Le produzioni della piccola pesca, infatti, sebbene con quantità ridotte rispetto a quelle garantite da altri sistemi di cattura, sono spesso caratterizzate da un elevato valore commerciale. Lo stretto legame con un areale geografico relativamente limitato e gli sbarchi giornalieri determinano un elevato livello di apprezzamento riconducibili alla qualità organolettica delle specie catturate ed alla freschezza del prodotto.

Tuttavia le problematiche connesse al consumo dei prodotti ittici sono molteplici e particolare importanza riveste la possibile presenza di parassiti, in quanto essi oltre a causare problemi nel pesce (gravi stati anemici e di emaciazione, diminuzione delle performance riproduttive) ed indurre modificazioni dei profili chimici e nutrizionali delle carni possono essere responsabili di zoonosi.

Al fine di fornire un contributo alla valutazione della qualità igienico sanitaria del pesce azzurro del golfo di Napoli, il presente progetto si pone l'obiettivo di identificare e valutare la prevalenza di parassiti responsabili di zoonosi in alici pescate nelle acque del golfo di Napoli e di Pozzuoli.

Anisakiosi o Anisakidosi

E' una zoonosi parassitaria provocata dalla ingestione di nematodi anisakidi in seguito al consumo di preparazioni alimentari a base di pesci di mare crudi o poco cotti (sushi, sashimi, pesce blandamente affumicato o marinato).

Una volta ingerite queste larve determinano la cosiddetta sindrome da "larva migrante" in quanto si possono localizzare a livello di cavità addominale, duodeno, esofago, mesentere, parete addominale, sul grande omento, pancreas, fegato, lingua, polmone, gangli linfatici, tessuti peritesticolari.

Una volta penetrate in una di queste sedi determinano una reazione da corpo estraneo che può evolvere come un flemmone, un ascesso, un ascesso-granuloma o più frequentemente come granuloma.

La patogenesi non è dovuta solo all'azione fisica della perforazione causata dalle larve ma anche alla reazione allergica che esse possono scatenare. Nel caso della localizzazione allo stomaco l'individuo, già dopo circa 4-5 ore dall' ingestione, avverte una forte dolorabilità a livello dell'addome (in particolare nella *regione epigastrica*); il mal di stomaco è accompagnato da sensazioni di nausea e da vomito.

Se, invece, la penetrazione delle larve si verifica a livello dell'intestino i primi sintomi appaiono dopo circa una settimana; in questi casi la più o meno violenta dolorabilità viene avvertita nella parte bassa dell' addome; anche qui si avvertono sensazioni di nausea e di vomito, ma esse sono complicate da fenomeni di meteorismo e dalla comparsa di febbre (*M. T. Manfredi univ. di Milano Parassiti nei pesci e implicazioni sanitarie*).

Tab.1 Casi di anisakiosi nel mondo (Fioravanti *et al*, 2006)

| <i>Anisakiosi nel mondo</i> |
|--|
| Olanda: dal 1955 al 1968 □ 160 casi (sostenuti prevalentemente dal genere <i>Anisakis</i>) |
| Prima segnalazione ufficiale: Van Thiel (1960) descrive in Olanda anisakiosi umana in correlazione all'abitudine di consumare aringhe affumicate a freddo ("green herring"). |
| Giappone: 16.090 casi diagnosticati fino al 1990 (sostenuti prevalentemente da <i>Anisakis</i> - solo circa 50 casi da <i>Pseudoterranova</i>) |
| Usa: circa 10 casi/anno diagnosticati (sostenuti frequentemente da larve di <i>Pseudoterranova</i>) |
| Francia: circa 6-7 casi all'anno, dovuti soprattutto a larve di <i>Anisakis</i> |
| Casi sporadici in Spagna, Germania, Danimarca, Inghilterra, Norvegia, Belgio, Cile, Canada |
| In Italia il 1° caso ad eziologia certa risale al 1996, la paziente presentava una violenta epigastralgia associata a vomito e diarrea. |

Parassiti del genere *Anisakis*

Alla famiglia *Anisakidae* appartiene la subfamiglia *Anisakinae*, con i generi *Anisakis*, *Contracaecum* e *Pseudoterranova* (sin. *Phocanema*, *Terranova*, *Porrocaecum*) e la subfamiglia *Raphidascaridine*, con il genere *Hysterothylacium*. Al genere *Anisakis* appartengono tre specie:

- 1) *A. Pegreffii* (in precedenza denominata *A. Simplex A*), rinvenuta nei pesci del Mar Mediterraneo;
- 2) *A. Physeteris* rinvenuta nei pesci del Mar Mediterraneo;
- 3) *A. Simplex S.S.* (in precedenza denominata *A. Simplex B*), rinvenuta nei pesci dell'Oceano Atlantico e Mar del Nord.

Sono parassiti più o meno filiformi, a sezione circolare e spesso con le estremità assottigliate. Hanno grandezza variabile ed apparato digerente completo. I sessi sono

separati: dall'uovo si sviluppa un embrione, che può liberarsi quando un ospite lo ingerisce oppure si libera attivamente.

La localizzazione naturale del parassita adulto è il tratto gastrointestinale di mammiferi marini, che eliminano con le feci le uova del parassita. Le prime forme larvali sono reperibili in crostacei planctonici, che costituiscono il primo anello del ciclo riproduttivo e nei quali il parassita evolve sino al terzo stadio.

Il pesce costituisce l'ospite intermedio di questo parassita, mentre numerosi mammiferi marini e l'uomo rappresentano gli ospiti definitivi, nei quali le larve si localizzano nello stomaco e nell'intestino divenendo adulte.

Le uova eliminate con le feci in ambiente acquatico embrionano, originando la larva L1 e, dopo una prima muta in L2 che, se ingerita, da un crostaceo, si trasforma in L3, ripetendo il ciclo biologico prima descritto (Fig.1).

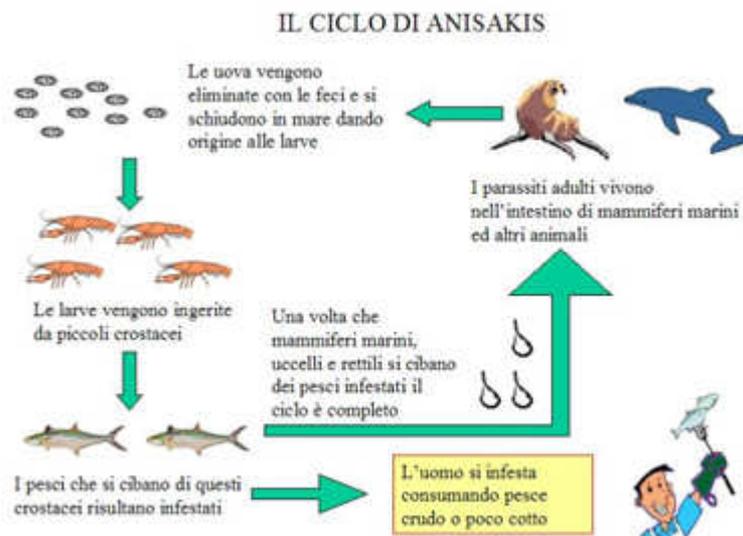


Fig. 1

Nel pesce la localizzazione viscerale è nettamente prevalente rispetto a quella muscolare; quest'ultima, pur essendo possibile anche *intra-vitam*, inizia già dalle prime ore dopo la morte del pesce e viene facilitata da ritardata, insufficiente o discontinua refrigerazione (Tab. 2)

Tab. 2 : Localizzazione delle larve (Fioravanti *et al*, 2006)

| Localizzazione dell'anisakis in cavità peritoneale e visceri | Localizzazione dell'anisakis a livello muscolare anche intra vitam |
|--|--|
| Aringa | Nasello |
| Suro | Merlano |
| Sgombro | Scorfano |
| | Triglidi |

Resistenza delle larve

Le larve di parassiti anisakidi hanno diverso comportamento ai trattamenti termici, in particolare si è visto che a $T^{\circ} < 30^{\circ}\text{C}$ esse non sopravvivono oltre i 5 minuti; a $T^{\circ} < 17^{\circ}\text{C}$ resistono invece per circa 5 ore. A -10°C la sopravvivenza supera la settimana, mentre a -5 circa tre settimane e quasi 50 giorni alla temperatura di -2°C . Mentre a $T^{\circ} \geq 60^{\circ}\text{C}$ le larve sono devitalizzate immediatamente, occorre un quarto d'ora a 50°C e circa un'ora e venti minuti a 45°C .

Nei confronti di trattamenti tecnologici il comportamento è alquanto diverso.

La *marinatura* infatti riesce a devitalizzare le larve soltanto dopo circa 4 settimane con una concentrazione del 6% di sale e del 4% di acido acetico; i tempi sono più brevi se il pesce è marinato in una soluzione con almeno il 6,5% di sale e con un pH inferiore a 4 . Il solo *aceto* è efficace dopo due settimane, mentre la *mostarda dolce* lo è già prima di una settimana .

In seguito ad *affumicatura* la percentuale di sopravvivenza di larve di *Anisakis* è dell'87% circa se la temperatura impiegata è di 28°C; mentre si abbassa al 14,4% se la temperatura sale a 40°C. In tutti i casi invece in cui il procedimento di affumicamento a caldo prevede l'uso di una temperatura che oscilli fra 53 e 60°C la devitalizzazione è completa.

PARTE SPERIMENTALE

L'indagine è stata condotta su un numero di 4117 alici (*Engraulis encrasilocus*) catturate nelle acque prospicienti il golfo di Napoli (lat. 40°50'0" e long. 14°15'0") e analizzate singolarmente. In particolare i pesci su cui è stata effettuata la ricerca provenivano dai seguenti specchi d'acqua: Ischia (27,78%), Procida (17,29%), Licola (15,66%), Pozzuoli-Miseno (10,68%), Castellammare di Stabia (12,50%) e Napoli (16,05%) (Fig.2).

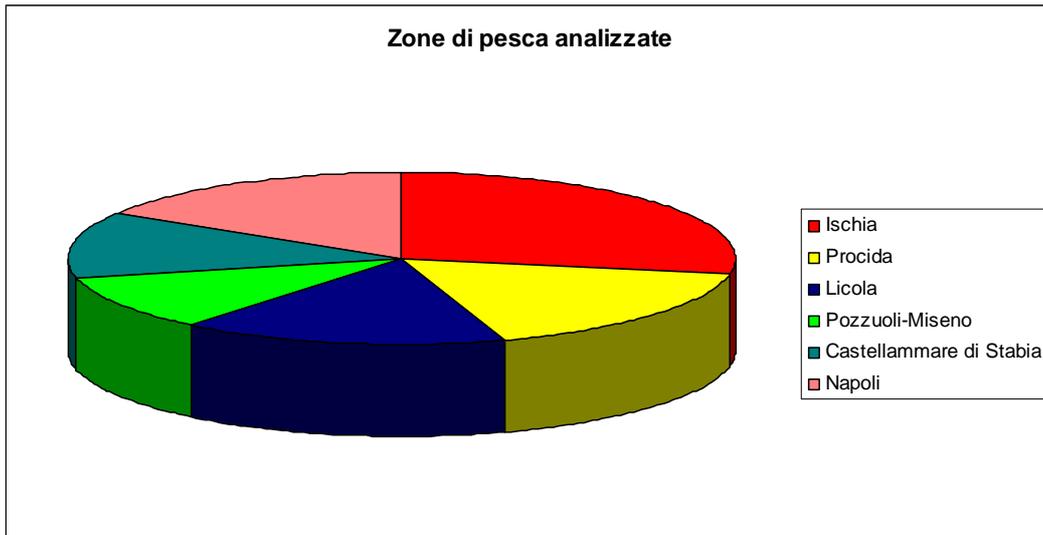


Fig. 2

Il campionamento è stato effettuato presso il Mercato Ittico di Pozzuoli al momento dello sbarco dei pescherecci (Figg. 3-4-5-6).



Fig.3



Fig.4



Fig.5



Fig.6

In questa fase si è “tracciato” il campione riportando su un’apposita scheda (Tab. 4) il nome del peschereccio, la zona di pesca ed il quantitativo pescato totale riferito alla battuta di pesca e il quantitativo rappresentativo di alici campionate.

Tab. 4 : Schema della scheda con cui sono stati tracciati i campioni

| Peschereccio | Luogo di pesca | Kg alici campionate | N° alici campionate |
|-----------------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|
| | | | |
| M/P Angela Madre | Pozzuoli-Miseno | 3,7 | 440 |
| | | | |
| M/P Ciro Padre NA 2285 | Procida | 2,3 | 183 |
| Campania Import S.r.l. Portici/NA | Sorrento | 1,35 | 134 |
| | | | |
| M/P Angela Madre | Procida-Ischia | 3,3 | 529 |
| | | | |
| D'Alessio Giuseppe | Castellammare di Stabia | 2,05 | 140 |
| | | | |
| D'Alessio Giuseppe | Castellammare di Stabia | 1,7 | 135 |
| | | | |
| D'Alessio Giuseppe | Castellammare di Stabia | 1,2 | 106 |
| | | | |
| M/P Blu fish | Ischia | 0,6 | 84 |
| Coop Santaniello | Licola | 1,7 | 265 |
| | | | |
| M/P Blu fish | Licola | 2,7 | 380 |
| | | | |
| M/P S. Vincenzo | Ischia | 2 | 280 |
| | | | |
| M/P S. Vincenzo | Ischia | 2,4 | 523 |
| | | | |
| M/P S. Vincenzo | Ischia | 2,1 | 257 |



Fig.7



Fig.8

Ricerca parassita

La ricerca delle larve di Anisakidi è stata eseguita secondo lo schema di seguito descritto:

Le alici prelevate con dalla cassetta (Figg. 7-8) e pronte per la commercializzazione, venivano deposti su un ripiano (Figg. 9-10) dove si procedeva all'apertura della cavità celomatica, infilando la punta delle forbici nell'apertura anale e tagliando lungo la linea ventrale fino alla base degli opercoli. Si effettuava un altro taglio col coltello perpendicolare al taglio ventrale, indi si solleva il lembo di tessuto laterale e si osservavano i visceri contenuti in cavità celomatica. Si ispezionavano accuratamente lo stomaco, il fegato, la milza, le gonadi, il mesentere e tutto il peritoneo, nonché l'intestino (Figg. 11-12-13-14-15).



Fig.9



Fig.10



Fig.11



Fig.12



Fig.13



Fig.14



Fig.15

Fig.16

La vitalità delle larve, eventualmente presenti, è stata verificata direttamente in cavità celomatica. Successivamente si è proceduto all'osservazione del tessuto muscolare, di

ogni singolo esemplare, mediante transilluminatore. Le alici risultate infestate venivano misurate dall'apice del muso, a bocca chiusa, fino all'estremità del lobo più lungo della pinna codale (Fig.16). Le larve ritrovate venivano poste singolarmente in provette eppendorf con una goccia di acqua distillata e poi stoccate a temperatura di -20°C .

Identificazione

L'identificazione delle forme larvali del genere *Anisakis* è stata effettuata presso il Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica dell'Università La Sapienza di Roma mediante l'utilizzo dei marcatori genetici ottenuti dall'elettroforesi multilocus, tale tecnica permette la precisa identificazione a qualsiasi stadio di sviluppo dei parassiti sulla base dei loci enzimatici diagnostici evidenziati tra le specie di *Anisakis*.

In particolare i diversi alleli osservati ai loci enzimatici diagnostici sono stati: Mdh, Adk, Mpi , Ap, Pgi, 6-Pgdh, GOT esistenti nelle diverse specie di *Anisakis* (Figg. 17-18-19-20-21-22).



Fig.17

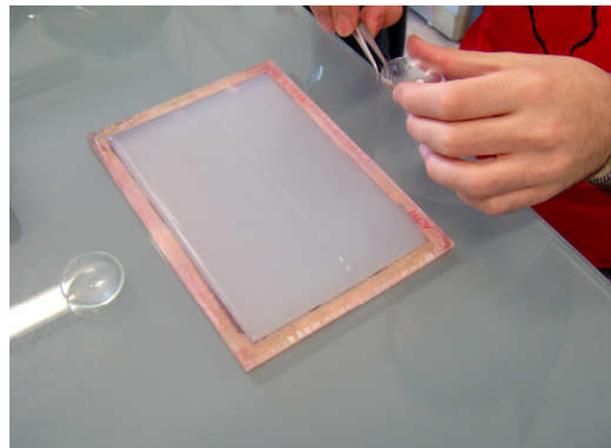


Fig.18

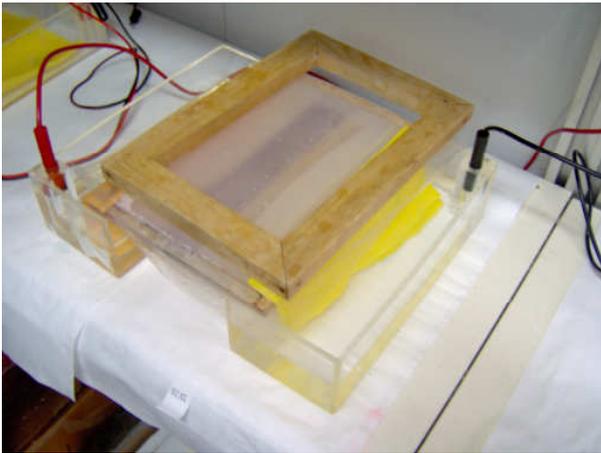


Fig.19



Fig.20



Fig.21



Fig.22

RISULTATI DELLA SPERIMENTAZIONE

Dei 4117 campioni esaminati, 20 esemplari sono risultati positivi all'esame visivo della cavità celomatica e 1 all'esame della muscolatura con transilluminatore. La maggior parte delle larve è stata ritrovata in soggetti pescati nello specchio d'acqua a largo di Pozzuoli-Miseno (7) e Napoli (7), 4 sono state trovate in alici raccolte lungo la fascia costiera davanti al comune di Licola (NA), 2 in esemplari provenienti da Castellammare di Stabia (NA), 1 a Procida (NA). La maggior parte delle larve (19) sono state evidenziate in alici di lunghezza compresa tra i 10 e i 12 cm, soltanto due provenivano da esemplari di lunghezza inferiore ai 10 cm (9 cm).

La valutazione dei livelli di infestazione parassitaria è stata calcolata mediante i parametri di seguito riportati:

1) *Prevalenza* (P), espressa usualmente in percentuale, è data dal rapporto del numero totale di ospiti parassitati e il numero totale di ospiti esaminati, nella sperimentazione il valore è stato pari a 0.51%.

2) *Abbondanza* (A), espressa come il rapporto tra il numero totale di esemplari di una specie parassitata ritrovati nel campione della specie ospite e il numero di ospiti esaminati, è risultata essere pari a 0.00024.

3) *Intensità media* (Im) che esprime il rapporto tra il numero totale di esemplari di una specie parassita ritrovata nel campione della specie ospite e il numero di ospiti parassitati da quella specie, è stata pari a 1.

Mediante osservazione al microscopio ottico ed analisi morfologica della struttura della larva si è accertato che i parassiti appartenevano alla specie *Anisakis* spp. ed erano allo stadio L₃.

L'elettroforesi multilocus dei marcatori genetici (Mattiucci *et al*,1986;1997;2001a 2001b) ha permesso l'identificazione delle larve come tutte appartenente alla specie *Anisakis pegreffii*.

DISCUSSIONE

I cambiamenti gastronomici osservati negli ultimi anni con l'avvento di una cucina che prevede la somministrazione di pesce crudo e il ritorno alle tradizioni locali con preparazioni a base di pesce blandamente cotto o poco trattato impongono una stretta sorveglianza igienico-sanitaria sui prodotti ittici.

Per quanto riguarda le parassitosi dei prodotti della pesca il recente Reg. CE 2074/2005, recante modalità di attuazione relative a taluni prodotti di cui al Reg. CE 853/2004 e all'organizzazione di controlli ufficiali a norma dei Regg. 854/2004 e 882/2004, stabilisce che spetta agli operatori del settore effettuare controlli in tutte le fasi della produzione dei prodotti della pesca affinché quelli palesemente infestati da

parassiti non siano immessi sul mercato per il consumo umano. Stabilisce in particolare che il controllo visivo deve essere effettuato su un numero rappresentativo di campioni. I responsabili degli stabilimenti a terra e le persone qualificate a bordo delle navi officina determinano, in funzione della natura dei prodotti della pesca, della loro origine geografica e del loro impiego, l'entità e la frequenza dei controlli. Qualora sia tecnicamente necessaria, la speratura dei filetti dovrà essere inclusa nel piano di campionamento.

Parallelamente il Regolamento 853/2004 al fine di tutelare la sicurezza del consumatore dalla ingestione di larve di parassiti, stabilisce che è necessario sottoporre le specie ittiche ritenute pericolose in quanto frequentemente infestate, a trattamento termico (62 °C per 10') e quelle destinate a consumarsi praticamente crude al congelamento a - 20 °C per 24 ore.

E' opportuno ricordare che con il congelamento in determinate specie ittiche si verificano modificazioni delle caratteristiche organolettiche (consistenza in primis) che possono condizionare il destino commerciale del pesce. Tuttavia lo stesso regolamento, più volte citato, all'art.11, riporta che “.....possono essere fissate misure di attuazione o adottate modifiche, tra le altre cose, per:

specificare criteri volti a determinare quando i dati epidemiologici indicano che una zona di pesca non presenta rischi sanitari con riguardo alla presenza di parassiti e, di conseguenza, quando l'autorità competente può autorizzare gli operatori del settore alimentare a non congelare i prodotti della pesca.

In altre parole, relativamente alla presenza dei parassiti in alcuni prodotti della pesca, è possibile derogare al trattamento col freddo per i pesci consumati crudi o praticamente crudi, nel caso in cui:

- a) i dati epidemiologici disponibili indichino che le zone di pesca d'origine non presentano rischi sanitari con riguardo alla presenza di parassiti;
- b) le autorità competenti lo autorizzino.

E' opportuno però sottolineare che la deroga suddetta può essere concessa solo nel caso in cui sussistano dati epidemiologici affidabili viste le fluttuazioni biologiche di diversi parassiti zoonosici, *Anisakis* in primis.

In base al Codex Alimentarius la presenza di nematodi nei tessuti dei pesci è tollerata fino a 5 parassiti/Kg di carne, laddove parassita visibile è un parassita di almeno 3 mm di diametro o 1 cm di lunghezza.

Da quanto detto e considerato i risultati di questa sperimentazione, pur se preliminari in quanto svolta per un periodo limitato e su un numero di soggetti contenuto, verrebbe provato che le alici pescate le acque prospicienti la città e la provincia di Napoli, potrebbero rientrare nella deroga summenzionata e quindi poter essere destinate alla lavorazione senza il preventivo trattamento di congelamento. La prevalenza d'infestione riscontrata è infatti notevolmente al di sotto dei valori fissati dal Codex Alimentarius, da quelli riportati in letteratura e accettati come soglia;

Se gli studi epidemiologici futuri confermeranno questi risultati il pesce azzurro di queste zone ed in particolare le alici, uno dei prodotti ittici che maggiormente le caratterizza, sarà enormemente rivalutato, con notevoli ritorni economici potendo essere consumato per preparazioni gastronomiche che ne prevedono l'uso crudo senza il preventivo trattamento con il freddo.

In conclusione è opportuno tuttavia ribadire, anche alla luce del presente status normativo, che la profilassi dell'anisakiasi umana da consumo di pesce azzurro passa oltre che da un trattamento di congelamento per quei pesci destinati ad essere consumati crudi o blandamente trattati anche e soprattutto da un'approfondita conoscenza epidemiologica non disgiunta da un'efficace opera di educazione sanitaria ed alimentare del consumatore.

Tab. 3 : Metodi di prevenzione e controllo (Fioravanti *et al*, 2006)

| |
|--|
| Metodi di prevenzione e controllo |
| Educazione alimentare |
| Eviscerazione rapida dopo la pesca |
| Controllo ispettivo (Reg. Ce 853/ 854/2004; Reg CEE 2074/05) |
| Trattamenti del prodotto ittico atti a devitalizzare le larve: Alte temperature: 70°C (1'') 50°C (15') 45°C (78') Basse temperature: -35°C (15 ore) -20°C (24-48 ore) -10°C (oltre 7 giorni) |

Bibliografia:

- 1) International Day for Zoonoses and Foodborne Diseases 24/05/2007 Andrea Gustinelli – DSPVPA, Università di Bologna.
- 2) Maggi P., Caputi-Lambrenghi O., Scardino A., Scoppetta L., Saracino A., Valente M., Pastore G., Angarano G.: Gastrointestinal infection due to *Anisakis simplex* in Southern Italy. *European Journal of Epidemiology*. 2000, 16: 75-78.
- 3) Pampiglione S., Rivasi F., Criscuolo M., De Benedittis A., Gentile A., Russo S., Testini M., Villani M.: Human Anisakiosis in Italy: A Report of Eleven New Cases. *Pathology Research and Practice*. 2002, 198: 429-434.
- 4) Stallone O., Paggi L., Balestrazzi A., Mattiucci S., Montanari M.: Gastric anisakiosis in Italy: case report. *The Mediterranean Journal of Surgery and Medicine*. 1996, 1: 13-16.
- 5) Marrone R., Damiano S., Panzardi M., Palma G., Mattiucci S., Anastasio A. "Occurrence of *Anisakis pegreffii* larvae in the anchovy *engraulis encrasicolus* caught off naples gulf (italy)" 7th International Symposium on Fish Parasites, Viterbo (RM) 24-25-26-27-28 Settembre 2007.
- 6) Panebianco A., Lo Shiavo A.: Ulteriori indagini sulla presenza di larve di *Anisakis* in aringhe salate e affumicate. *Riscontro di una larva viva*. *Industrie alimentari*. 1987, 252: 778-780.