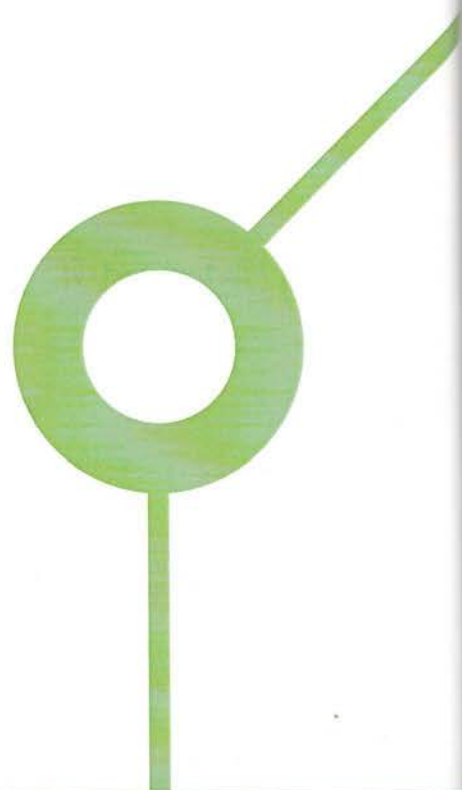


Il Regolamento (CE) n. 2074/2005, al capitolo II, fornisce indicazioni piuttosto precise relativamente al controllo visivo volto alla ricerca dei parassiti visibili nei prodotti della pesca che sono eviscerati, sfilettati o tranciati.

Ulteriori tre interessanti specificazioni possiamo desumerle dalla nota inviata dalla DG SANCO al Ministero Spagnolo che ho sopra menzionato. In particolare viene riportato quanto segue:

1. "Se dopo l'eviscerazione si osservano parassiti nella cavità addominale, ovaie, fegato, milza, i prodotti della pesca possono essere destinati al consumo umano se il responsabile dell'impresa adotta tutte le misure necessarie affinché i parassiti visibili siano eliminati".
 2. "Se al controllo visivo il Responsabile dell'impresa individua alcuni parassiti visibili, ha l'obbligo di eliminarli, per evitare che siano posti in commercio prodotti chiaramente contaminati da parassiti".
 3. "Le parti dei prodotti della pesca che non presentano parassiti visibili possono essere destinati al consumo umano, anche se provengono da parti di pesce chiaramente infestati da parassiti, una volta che questi siano stati toleltati ed i parassiti rimossi".
- Alla luce di queste indicazioni è chiaro che la presenza anche di una sola larva di parassiti della famiglia Anisakidae riscontrata all'esame visivo delle porzioni muscolari di prodotti della pesca eviscerati, sfilettati o tranciati comporterà l'adozione di adeguati provvedimenti restrittivi affinché tali prodotti non siano posti in commercio. Rimane invece irrisolto l'ormai annoso problema di come eseguire i controlli visivi sui prodotti della pesca venduti tal quali (quindi non eviscerati, non sfilettati o non tranciati) ed in particolare se l'esame visivo debba essere condotto tramite apertura della cavità celomatica nei prodotti commercializzati interi. In particolare è necessario che sia chiarito, al più presto ed in modo inequivocabile, quale significato debba essere dato alla definizione "esame non distruttivo di pesci o prodotti della pesca", citata al capitolo I del Regolamento (CE) n. 2074/2005. Solo in questa maniera si potrà raggiungere l'omogeneità, sia a livello nazionale che comunitario, nella valutazione dell'idoneità sanitaria delle partite di prodotti della pesca e saranno evitati comportamenti difformi, anche a livello di Aziende sanitarie locale vicine, sul destino dei questi prodotti. È evidente che tale indispensabile chiarimento, una volta disponibile, avrà una significativa influenza sul numero delle notifiche RASFF¹.

Alla luce di tutto quanto suddetto, Eurofishmarket vuole di seguito presentare uno strumento innovativo nella ricerca dell'Anisakis che è in fase di sperimentazione avanzata e di validazione. "TrichinEasy è in grado di rilevare l'Anisakis in modo molto efficace nei prodotti ittici e dunque il nostro interesse è comprendere meglio questo nuovo strumento e capirne il suo futuro potenziale utilizzo sul mercato internazionale ai fini del sistema di controllo ufficiale o di autocontrollo nel settore ittico dal produttore al distributore. Sicuramente potrebbe essere interessante per contribuire a "certificare" i prodotti ittici di acquacoltura come "anisakis free". Chiediamo dunque al Prof. Andrea Armani, Responsabile FishLab del Dipartimento di Scienze Veterinarie di Pisa di illustrarci lo strumento TrichinEasy, le sue applicazioni ed i suoi sviluppi.



L'INTERVISTA AL PROF. ANDREA ARMANI

Professor Armani in cosa consiste il metodo TrichinEasy?

Lo strumento TrichinEasy permette di automatizzare la digestione cloro-peptica del tessuto muscolare al fine di mettere in evidenza le larve di parassiti eventualmente contenute in esso. Per questo motivo, pur essendo stato inizialmente ideato per la ricerca di larve del genere *Trichinella* nel muscolo di mammifero, è stato successivamente applicato anche alla ricerca di larve di nematodi anisakidi nel muscolo di pesce. Lo strumento è dotato di un beaker autoriscaldante e provvisto di lame che possono essere usate per la triturazione dei tessuti (nel caso della ricerca di larve di *Trichinella*) o semplicemente per l'agitazione della soluzione durante la fase di digestione (nel caso della ricerca di larve macroscopiche come quelle di anisakidi). La temperatura, la durata della digestione e la velocità delle lame possono essere impostate in fase iniziale dal pannello di comando dello strumento. Successivamente, completata la digestione, la filtrazione del materiale residuo è facilitata dalla presenza di una pompa che permette di rimuovere la componente liquida e raccogliere il materiale residuo nel quale, se presenti, si ritrovano le larve dei parassiti. La macchina è dotata di un prefiltro (diametro 500 o 180 µm) da utilizzare eventualmente in combinazione con una membrana filtro (diametro 14-30 µm), a seconda delle dimensioni del parassita ricercato. Nel caso dei prodotti della pesca il processo di digestione (di massimo 200 g di tessuto) si completa nel giro di 20-30 min e per la ricerca di nematodi anisakidi è sufficiente utilizzare il prefiltro da 500 µm.

E' un metodo affidabile e validato?

Il metodo è stato validato per la ricerca di larve di nematodi anisakidi nei prodotti della pesca dal Centro di Referenza Nazionale per le Anisakiasi (C. Re. N. A) che si trova presso la sede centrale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia A. Mirri. Il processo di validazione è stato pubblicato nel lavoro: Cammilleri G., Chetta M., Costa A., Graci S., Collura R., Buscemi M. D., Cusimano M., Alongi A., Principato D., Giangrosso G. & Vella A. (2016) Validation of the TrichinEasy® digestion system for the detection of Anisakidae larvae in fish products. *Acta parasitologica*, 61(2), 369-375. Pertanto, alla luce di queste prove di validazione, il nostro laboratorio si è occupato della messa a punto di specifici protocolli in funzione della specie (acciuga o altro) da analizzare e della tipologia di tessuto (tessuto muscolare e visceri, tessuti freschi o processati). La ditta ci ha recentemente informato sul fatto che lo stesso C. Re. N. A ha proceduto con successo all'accreditamento del metodo, attualmente in fase di pubblicazione ufficiale.



Quanti laboratori in Italia sono dotati di tale metodo?

Ad oggi sono dotati di tale metodo l'IZS delle Sicilie (sede di Palermo), l'IZS di Lombardia e Emilia Romagna (sede di Brescia) e l'IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (sede di Torino).

Quanti sono i partner con i quali avete collaborato in merito a questa metodica?

Fino ad oggi abbiamo utilizzato lo strumento nell'ambito di ricerche sviluppate dal nostro laboratorio (FishLab, <http://fishlab.vet.unipi.it>) del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Pisa. Nel corso di tali ricerche abbiamo collaborato con ricercatori del Dipartimento di Scienze Agrarie dell'Università di Torino e della sede di Torino dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta e con il personale veterinario dell'ASL di La Spezia. Abbiamo inoltre in corso di approvazione progetti di ricerca in collaborazione con la grande distribuzione organizzata e con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Lazio e Toscana.

Essendo il metodo "distruttivo" potrebbe essere contestato dalla controparte in caso di positività?

Ad oggi la digestione cloro-peptica è generalmente considerata il gold standard fra le metodiche utilizzate per la ricerca dei parassiti in quanto dotata di sensibilità più elevata rispetto ad altre metodiche non distruttive come l'osservazione ad occhio nudo o la speratura. L'idea che ci ha portati ad utilizzare questo strumento a supporto del controllo ispettivo dei prodotti della pesca è stata quella di poter sviluppare, come nel caso della ricerca di larve di *Trichinella*, un protocollo di campionamento che permetta, attraverso la digestione di un campione rappresentativo, di stimare il livello di infestazione della partita di pesce. Pertanto, anche se distruttivo, eventuali contestazioni potrebbero essere evitate attraverso un campionamento in doppio che permetta di ripetere l'analisi.

Il metodo verifica la presenza / assenza dei parassiti o anche la quantità in ogni campione?





Il metodo permette la raccolta di tutti i parassiti presenti in un campione. Pertanto permette di calcolarne anche la quantità.

Il metodo rileva la specie o solo il genere del parassita?

Il metodo permette esclusivamente di recuperare le larve di nematodi anisakidi presenti nel tessuto analizzato. La successiva tipizzazione a livello di genere e o specie deve essere condotta da personale specializzato attraverso l'osservazione microscopica della larva (in tal caso si può ottenere un'identificazione a livello di genere) o tramite metodiche molecolari per ottenere un'identificazione specifica.

Quali sono, se ci sono state, le principali criticità riscontrate in questo metodo o nella sua messa a punto?

Le criticità inizialmente riscontrate, legate alla regolazione della velocità delle lame, al mantenimento di un'adeguata temperatura durante la digestione e al setaccio del prefiltro sono state risolte grazie al supporto tecnico della ditta.

Quali sono a suo parere i vantaggi di questo metodo?

Una volta sviluppato un piano di campionamento specifico per la specie ittica da analizzare, il metodo, grazie alla rapidità di esecuzione, potrebbe essere utilizzato nella pratica per il controllo ispettivo. In particolare, potrebbe rappresentare un valido ausilio per le analisi da effettuare nell'ambito di un piano di autocontrollo, presso piattaforme di distribuzione e mercati ittici.

Può raccontarci un progetto pilota che ha svolto per testare la metodica che risultati ha dato e quali sono secondo lei le aziende target di questo prodotto?

Uno dei *progetti nell'ambito del quale abbiamo utilizzato il Trichineasy è stata la messa a punto di un protocollo di campionamento associato ad un'analisi digestiva da applicare per la stima del livello di infestazione di partite di acciughe fresche. La metodica è stata applicata su 57 campioni, costituiti da 29 acciughe ciascuno, derivanti da diverse partite. Il campionamento è stato effettuato presso il Mercato





ittico di Viareggio.

L'impiego di 29 acciughe come campione rappresentativo per partite di acciughe costituite da più di 600 individui è stato scelto in base alla normativa implementata della regione Lombardia (Lettera Circolare VS8/C790/94), ma adottata anche in altre regioni d'Italia (D'amico P., Malandra R., Costanzo F., Castigliengo L., Guidi A., Gianfaldoni D., Armani A. (2014) Evolution of the Anisakis risk management in the European and Italian context. Food research international, 64, 348-362). Considerando che la maggior parte delle larve di anisakidi è localizzato a livello viscerale e dei muscoli adiacenti (belly flaps), il lavoro ha avuto l'obiettivo di confrontare l'affidabilità della digestione di questa parte rispetto alla digestione completa del campione. Da ciascuna acciuga è stata sezionata, mediante due tagli trasversali (dietro l'opercolo e in corrispondenza dell'apertura anale), la parte centrale costituita dai visceri e dal muscolo adiacente (VM). Sono stati quindi digeriti 150 (± 30) g di VM prelevati dalle 29 acciughe in esame. Il tempo di digestione necessario è di circa 20 minuti. Il livello di infestazione (numero di larve raccolte) riscontrato in questa parte è stato successivamente confrontato con il livello di infestazione trovato con la digestione completa di ciascun campione. L'elevata correlazione tra il numero di larve riscontrato in 150 (± 30) g di VM e quello nel campione totale dimostra che l'analisi di soli 150 (± 30) g di VM è rappresentativa dello stato di infestazione del campione intero e possa essere pertanto una valida alternativa alla sua completa digestione. Questo consente una riduzione dei tempi e dei costi di analisi in quanto il campione può essere digerito in una sola aliquota.

Al contrario per digerire completamente 29 acciughe sono necessarie 2-3 digestioni da massimo 200 g, a seconda delle dimensioni degli esemplari. La semplicità della procedura insieme alla tempistica rapida consentirebbero l'esecuzione della metodica proposta anche agli operatori del settore alimentare nel corso di analisi in autocontrollo.

Ringraziamo per l'intervista e per alcune delle foto presenti nell'articolo il Prof. Andrea Armani, PhD, Specialized in Food Inspection Responsabile FishLab (<http://fishlab.vet.unipi.it>) Dipartimento di Scienze Veterinarie di Pisa

¹ Dal Dossier " Il problema Anisakis " di Gualtiero Fazio, Responsabile S.S. Ispezione dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura ASL 2 savonese pubblicata sul numero di Eurofishmarket 21 del 2014.

*Il lavoro appena descritto è stato recentemente pubblicato: Guardone L., Nucera D., Pergola V., Costanzo F., Costa E., Tinacci L., Guidi A., Armani A. (2017) Visceral larvae as a predictive index of the overall level of fish batch infection in European anchovies (*Engraulis encrasicolus*): A rapid procedure for Food Business Operators to assess marketability. International Journal of Food Microbiology, 250, 12-18.