



“Controllo sanitario dei prodotti ittici alla luce della normativa nazionale e comunitaria: attività dell'IZS Sicilia”

Progetto Qualità e Sicurezza degli Alimenti di Origine Ittica

ISS Roma 19 Aprile 2011

***Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia
“A.Mirri” Palermo***

Il progetto di Ricerca Finalizzata 2006, capofila **I'ZS LT Roma** ha avuto come obiettivo principale lo studio **dei diversi aspetti emergenti di natura igienico sanitaria, tossicologica e nutrizionale che coinvolgono prodotti ittici sia d'allevamento sia selvatici.**

L'U.O IZS Palermo in questi tre anni di ricerca (2007-2010) ha fornito il proprio contributo scientifico, valutando l'aspetto sanitario sia dei prodotti ittici d'allevamento che marini pescati nella regione Sicilia.

Ciò anche in considerazione della natura insulare della regione siciliana e della notevole importanza del mare per l'economia locale.

Introduzione

Valutazione dell'aspetto igienico-sanitario, nell'ambito della sicurezza alimentare, mediante analisi batteriologiche, virologiche, chimiche e tossicologiche.

Popolazione oggetto di studio, inserita nelle indagini analitiche svolte dalla nostra UO, costituita da:

- molluschi bivalvi lamellibranchi
- specie ittiche allevate e pescate
- semiconserve ittiche

Regolamenti comunitari

Reg (CE) 853/2004 del 29 aprile 2004 Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio che **stabilisce norme specifiche in materia di igiene** per gli alimenti di origine animale:

Sezione VII Cap V: Norme sanitarie per i molluschi bivalvi vivi

Sezione VIII Cap V: Norme sanitarie per i prodotti della pesca

e s.m.i.

Reg (CE) 854/2004 del 29 aprile 2004 Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio che **stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali** sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano

Allegato II: Molluschi bivalvi vivi Capo II – Classificazione e monitoraggio zone di stabulazione e produzione

Allegato III: Prodotti della pesca Capo II – residui e contaminanti, controlli microbiologici, parassiti....

e s.m.i.

Regolamenti comunitari

Reg (CE) 2073/2005 del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari e s.m.i (Reg CE 1441/2007)

Cap I Criteri di sicurezza alimentare

Reg (CE) 2074/2005 del 5 dicembre 2005 *e s.m.i.*

Modalità di attuazione relative a taluni prodotti alimentari di cui al Reg 853 e 854/2004

All II Prodotti della pesca-norme relative ai controlli visivi per i parassiti

All III Metodi di analisi per le biotossine marine:

Cap I Metodi di determinazione delle tossine PSP (modif Reg 1664/2006 All I)

Cap II Metodi di determinazione delle tossine ASP (modif Reg 1244/2007 All I)

Cap I Metodi di determinazione delle tossine lipofile (modif Reg 15/2011 All)



■ **Intesa stato-regioni relativa alle linee guida sui prodotti della pesca e la nuova regolamentazione comunitaria**

DETERMINAZIONE 16 Novembre 2006

■ **Intesa stato-regioni sulle linee guida relative all'applicazione del Regolamento 2073/2005 sui criteri microbiologici nei prodotti alimentari**

DETERMINAZIONE 10 Maggio 2007 (GU N.124 del 30/05/2007)

- **Intesa stato-regioni relativa alle linee guida per l'applicazione dei Reg CE 854 e 853/2004 nel settore dei molluschi bivalvi**

DETERMINAZIONE 8 luglio 2010 (GU N.176 del 30/07/2010)

Normativa regionale

**Decreto Assessorato Sanità
27 Dicembre 2007**

**Recepimento delle intese tra il Governo,
le
Regioni e le Province autonome di Trento
e Bolzano in materia di sicurezza
alimentare (GURS Parte I n. 4/2008
Suppl Ord)**

*...in via di definizione Piano Regionale di Controllo Ufficiale sulla contaminazione
microbiologica degli alimenti 2011-2014 Regione Sicilia*

Popolazione oggetto di studio

➔ molluschi eduli lamellibranchi

- Allevamento
- Stabulazione
- CSM/CDM
- Commercializzazione
- Ristorazione

Siti di campionamento

- Impianti miticoltura Porto Grande Siracusa (zona B)
- Stabulazione lago Torre Faro Messina
- Allevamento ostriche Licata (zona A)

Inoltre: Mitili e vongole presso esercizi di ristorazione e commercializzazione

Strutture controllate

Zone di produzione:

(dal 2006) impianti di miticoltura

Siracusa, classificata come zona B,

3 impianti di mitilicoltura (Soc Coop)
operativi al 2008, ridotti a 2 nel 2009.

Tali impianti di miticoltura, siti presso il Porto Grande di Siracusa, (Latitudine $37^{\circ} 2' 16''$ - Longitudine $15^{\circ} 17' 23''$) sono stati istituiti a seguito Decr. R.S. Isp Gen San n° 8366 del 19/07/2006 e la specie allevata è *Mytilus galloprovincialis*

(dal 2007) allevamento ostriche Licata
(classificazione tipo A)



Strutture controllate

Zone di stabulazione:

mitili stabulati nel lago Torre Faro (Messina): in queste acque, divise in zone assegnate a 4 CSM di Messina, vengono sottoposti a stabulazione i mitili provenienti da zone dell'Alto e Medio Adriatico, prima di essere sottoposti a rifinitura e confezionamento, presso i CSM della zona, per l'immissione al commercio.



Analisi batteriologiche

- Ricerca *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002)
- Ricerca di *Salmonella* spp: RT-PCR (AOAC 120301: 2003)
Metodo VIDAS ICS (AFNOR BIO 12/6-03/99)

- Numerazione *E.coli* in MPN (ISO/TS 16649-3:2005)
- Ricerca *Vibrio cholera/Vibrio parahaemolyticus* (ISO/TS 21872-1:2007)
- Ricerca *Vibrio* spp. (ISO/TS 21872-2:2007)

(Identificazione: sistema API, MicroLog System Biolog)

Ricerca di biotossine algali

- Biotossine liposolubili e biotossine PSP (DM 16/05/2002: metodo biologico sul topo)
- Biotossine ASP (DM 16/05/2002: HPLC)

Materiali e metodi

MEL	2008	2009	2010	Totale
mitili	87	67	43	197
ostriche	10	20	15	45
vongole	7	4	12	23
totale	104	91	70	265

265 campioni sono stati sottoposti ad analisi batteriologiche, ricerca di virus e di biotossine algali (2008-2010)

Risultati

M.E.L.	n. camp	<i>Sfavorev</i> <i>E coli</i>	<i>Sfavorev</i> <i>Salmonella</i>	<i>Sfavorev</i> <i>Vibrio</i>	Biotossine
Mitili	197	4 CSM ME 330-1100 MPN/100 g	2 (<i>S. enteritidis</i>)	5 <i>V. parahaem</i> 18 <i>V. alginolyt</i>	1 (PSP)*
Ostriche	45	5 490-1100 MPN/100 g	1 (<i>S. thyphimurium</i>)	4 <i>V. alginolyt</i>	
Vongole	23	-		2 <i>V. alginolyt</i>	
	265	9 (3.4%)	3 (1.1%)	29 (11%)	1

*Impianti miticoltura SR: precedenti positività anno 2007 e contemporanea fioritura di *Alexandrium minutum*

V. parahaemolyticus

Tipologia campioni	provenienza	<i>Tdh</i>	<i>Trh</i>	Sierotipo
mitili	stabulazione ME	-	-	O10:K70
mitili	Allevamento SR	-	+	OUT K30
mitili	stabulazione ME	+	-	O8:K36
mitili	Allevamento SR	-	-	O3:K48
mitili	stabulazione ME	-	-	O11:K40

Analisi biomolecolare- PCR ricerca di geni specie-specifici (*toxR* e *tlh*) e geni tossigeni (*tdh* e *trh*) e Sierotipizzazione (IZS Umbria- Ancona)

Esami chimici

Metalli pesanti	Valori medi (mg/Kg)	Tenori massimi*
Cadmio	0.10	1.0
Piombo	0.18	1.5
Mercurio	0.00	0.5

80 campioni di molluschi bivalvi (mitili) sono stati sottoposti ad analisi chimiche (metalli pesanti, PCB -diossina simili e IPA)

(*consentiti nei moll bivalvi secondo Reg CE N.1881/2006)

Esami virologici

I campioni di M.E.L. sono stati sottoposti a ricerca di

Enterovirus, HAV, Norovirus e Adenovirus

Tutti i campioni esaminati sono risultati negativi per Enterovirus e Norovirus sia con tecniche di biologia molecolare (Norovirus) che con tecniche colturali (Enterovirus e Norovirus)

- **1 positività per HAV** con RT-PCR in un campione proveniente da un impianto di stabulazione di Messina: l'isolamento colturale è risultato negativo mentre il ceppo virale è stato confermato tramite sequenziamento.
- **Positivi per Adenovirus 9 campioni di mitili**, di cui 7 provenienti dall'area portuale di Siracusa: i campioni sono stati sequenziati e sono risultati N° 8/9 Adenovirus 2 (Ad2) e N° 1/9 Adenovirus 41 (Ad41)

La presenza di Adenovirus nei mitili esaminati e l'esito ottenuto potrebbe essere spiegato da una contaminazione di tipo ambientale, probabilmente durante le operazioni di raccolta e/o manipolazione del prodotto ittico, poiché gli Adenovirus rappresentano dei virus stabili e diffusi nell'ambiente, isolabili dalle acque o da matrici alimentari.

Indagine virologica

<i>Nested RT-PCR HAV</i>	<i>L. Croci et al. Rapporti ISTISAN 00/2</i>
<i>Booster RT-PCR Norovirus</i>	protocollo D.ssa L. Croci inviato luglio 2008
<i>RT-PCR Norovirus Genotipo 1</i>	<i>S. Kojima et al. 2002</i>
<i>RT-PCR Norovirus Genotipo 2</i>	<i>S. Kojima et al. 2002</i>
<i>SemiNested RT-PCR Enterovirus</i>	<i>M. Gilgen et al. 1997</i>
<i>Nested PCR Adenovirus</i>	<i>M. Formiga-Cruz et al. 2005</i>

L'indagine virologica condotta nell'ambito della RF 2006 ha permesso di mettere a punto e applicare le metodiche di laboratorio biomolecolari, fornite all'inizio del progetto dall'ISS (D.ssa L. Croci) e dall'IZS di Brescia (D.ssa N. Losio).

Popolazione oggetto di studio



specie ittiche pescate e allevate

Siti di campionamento

- Mercati ittici e pescherie
- Imbarcazioni per la pesca

Analisi batteriologiche: CMT a 30°C, Salmonella, E.coli, Vibrio spp

Analisi virologiche: Nodavirus, HAV e Adenovirus

Analisi chimiche: tenore in grasso e proteine, IPA, PCB, metalli pesanti

Analisi parassitologiche: Anisakidae

Materiali e metodi

Prodotti della pesca	n. esaminati 2008-2010
Teleostei (sgombri, naselli, alici, sardine, suri)	254
Pesci d'allevamento (spigole, orate)	24
Molluschi cefalopodi (polpo, calamari)	9
totale	287

Esame dei caratteri organolettici, identificazione di specie

Risultati

Tipologia campioni	CMT 30°C	<i>Salmonella</i>	<i>Vibrio</i>
sarde	1.6x10 ⁴ - 1.7x10 ⁶	1 (<i>S. thyphimurium</i>)	1 <i>V. parahaem</i> 8 <i>V. alginoly</i>
orate	1.0x10 ⁴		
sgombri	1.5x10 ⁴ - 2.7x10 ⁵		4 <i>V. alginolyt</i>
Polpo moscardino	1.2x10 ⁴ - 4.5x10 ⁵		
calamaro	1.8x10 ⁵ - 4.5x10 ⁵		2 <i>V. alginolyt</i> 2 <i>V. metschnikovii</i>

Nei campioni non è stata rilevata presenza di metalli pesanti, PCB e IPA

Ricerca di Anisakidae

	Teleostei		Moll. cefalopodi		Cons/semicons	
	esamin	posit	esamin	posit	esamin	posit
2007	203	20	11	-	40	-
2008	400	15	7	2	160	-
2009	342	55	9	-	137	-
Totale	945	90 (9.5%)	27	2	337	-

Dati RC IZS SI 08/06 -11/07

METODICHE DI ANALISI

Ricerca qualitativa di larve di *Anisakis*

Circolare 11 Marzo 1992, n°10 del MS “ Direttive e raccomandazioni in merito alla presenza di larve di *Anisakis* nel pesce”

Reg. (CE) N. 2074/2005 della Commissione del 5 dicembre 2005. G.U.U.E. L338
Allegato II, Sezione I

Ricerca delle larve di nematodi,
appartenenti al genere *Anisakis*,

- **esame visivo** nella cavità celomatica e nei visceri
- **transilluminazione** nel tessuto muscolare

pesci di mare destinati all'alimentazione umana
(pesce fresco, congelato, intero o preparato,
in filetti o in tranci)



METODICHE DI ANALISI

Identificazione di *Anisakis spp* mediante PCR-RFLP

Identificazione mediante tecnica PCR-RFLP, delle specie di nematodi anisakidi appartenenti al genere *Anisakis*: analisi, mediante enzimi di restrizione dopo amplificazione mediante PCR, della regione genomica nucleare che contiene gli spaziatori ribosomali ITS1 e ITS2, più la regione codificante per la subunità 5.8S.

S. D'Amelio et al (2000) Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *Int J Parasitol* 30: 223-226

X. Zhu et al (1998) Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol* 28: 1911-1921

S. D'Amelio et al (2010) Molecular detection of foodborne Pathogens Edited by Dongyou Liu CRC Press 2010, Section VI Foodborne Helminthes Chapter 54

Prevalenza (P), Intensità media (Im) e Abbondanza (A)

osservate nelle infestazioni da Anisakidae per specie ittica esaminata

specie	n. Esaminati	n. Infestati per genere	P%	Im	A
<i>Lepidopus caudatus</i>	10	10 <i>Anisakis</i>	100	4.6	4.6
<i>Trachurus trachurus</i>	37	17 <i>Anisakis</i>	46.0	23.1	10.6
		6 <i>Hysterothylacium</i> (2 coinfezione)	16.2	6.3	1.0
<i>Scomber scombrus</i>	20	7 <i>Anisakis</i>	35.0	2.0	0.7
<i>Merluccius merluccius</i>	43	7 <i>Anisakis</i>	16.3	4.6	0.7
		6 <i>Hysterothylacium</i> (2 coinfezione)	14.0	7.8	1.1

Progetto di Ricerca Corrente IZS SI 08/06 finanziato Ministero della Salute

Prevalenza (P), Intensità media (Im) e Abbondanza (A)

osservate nelle infestazioni da Anisakidae per specie ittica esaminata

specie	n. Esamin	n. Infestati per genere	P%	Im	A
<i>Mullus barbatus</i>	39	10 <i>Hysterothylacium</i>	25.6	5.4	1.4
<i>Mullus surmuletus</i>	13	8 <i>Hysterothylacium</i>	4.4	1.5	0.07
<i>Engraulis encrasicolus</i>	92	4 <i>Hysterothylacium</i>	16.7	1.0	0.2
<i>Aspitrigla cuculus</i>	11	4 <i>Hysterothylacium</i>	36.4	9.0	3.3
<i>Pagellus eritrinus</i>	11	5 <i>Hysterothylacium</i>	45.5	2.8	1.3
<i>Serranus scriba</i>	15	12 <i>Hysterothylacium</i>	80.0	4.3	3.4
<i>Zeus Faber</i>	6	5 <i>Hysterothylacium</i>	83.3	7.0	5.8
Totale	297	101			

Progetto di Ricerca Corrente IZS SI 08/06 finanziato Ministero della Salute

Specie esaminate	n. infest	n. larve esamin	<i>A. pegreffii</i>	<i>A. simplex s.str.</i>	<i>A. physeteris</i>
<i>Lepidopus caudatus</i>	13	22	100%(22)		
<i>Trachurus trachurus</i>	41	56	96.4%(54)		3.6% (2)
<i>Trachurus mediterraneus</i>	12	27	100%(27)		
<i>Scomber scombrus</i>	21	32	90.6% (29)	9.4% (3)	
<i>Merluccius merluccius</i>	13	23	87%(20)		13% (3)
<i>Micromesistius potassiou</i>	1	1	100%(1)		
<i>Engraulis encrasicolus</i>	4	4	100%(4)		
<i>Sardina pilchardus</i>	2	4	100%(4)		
<i>Brama brama</i>	1	1			100%(1)
<i>Zeus faber</i>	1	4	100%(4)		
<i>Phycis phycis</i>	1	2			100%(2)
<i>Molva</i>	1	2	100%(2)		
<i>Todaropsis eblanae</i>	2	2			100%(2)
totale		180	92.8% (167)	1.7%(3)	5.5%(10)

Progetto di Ricerca Corrente IZS SI 11/07 finanziato Ministero della Salute



Grazie dell'attenzione