

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in
“Disciplina nazionale ed europea sulla produzione ed il
controllo degli alimenti”

Ciclo XXIII

Efficacia del trattamento con HPP
(High Pressure Processing) nei confronti di
Anisakis spp. e Norovirus in prodotti della pesca

Relatore: Chiar.mo Prof. Franco Brindani

Correlatore: Dr. Giuseppe Arcangeli

Tutor: Chiar.mo Prof. Franco Brindani

Dottorando: Andrea Brutti

Sommario

1. INTRODUZIONE	3 -
1.1. Le nuove tendenze alimentari	4 -
1.2. Normativa sulla produzione e vendita dei molluschi bivalvi vivi	5 -
1.3. I virus enterici nella normativa CE	7 -
1.3.1. Direttive e raccomandazioni in merito alla presenza di larve di <i>Anisakis</i> spp. nel pesce	8 -
1.3.2. <i>Anisakis</i> spp. e la patologia nell'uomo	10 -
1.4. Le alte pressioni idrostatiche (HPP – High Pressure Processing)	13 -
1.4.1. Cenni storici	14 -
1.4.2. Trattamenti con le alte pressioni	16 -
1.4.3. Meccanismo delle alte pressioni	19 -
1.4.4. Effetti delle alte pressioni	20 -
1.4.4.1. Azione sull'acqua	20 -
1.4.4.2. Azione sui microrganismi	23 -
1.4.4.3. Azione sui parassiti	24 -
1.4.4.4. Azione sugli enzimi	24 -
1.4.4.5. Azione su colore, struttura e consistenza	27 -
1.4.5. Le alte pressioni nel settore alimentare	27 -
2. SCOPO DELLA TESI DI DOTTORATO	30 -
2.1. Obiettivo della tesi	31 -
3. MATERIALI E METODI	32 -
3.1. Materiali	33 -
3.1.1. Materie prime	33 -
3.1.1.1. Sgombri	33 -
3.1.1.2. Vongole veraci e Norovirus	34 -
3.1.2. Termosaldatrice	34 -
3.1.3. Impianto HPP	35 -
3.2. Metodi analitici	41 -
3.2.1. Ricerca di larve di <i>Anisakis</i> spp. mediante metodo della dissezione autoptica	41 -
3.2.2. Ricerca di larve di <i>Anisakis</i> spp. mediante metodica di Baermann	45 -

3.2.3. Ricerca di virus: saggio col metodo delle placche.....	- 47 -
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	- 49 -
4.1. Anisakis.....	- 50 -
4.2. Trattamento HPP di sgombri.....	- 52 -
4.3. Norovirus	- 58 -
5. CONCLUSIONI.....	- 62 -
5.1. Trattamento HPP di sgombri infestati da Anisakis	- 63 -
5.2. Trattamento HPP di vongole veraci	- 65 -
Bibliografia	- 66 -

1. INTRODUZIONE

1.1. Le nuove tendenze alimentari

Visionando il rapporto Censis relativo all'evoluzione delle abitudini alimentari degli italiani tra nuove tendenze e solide tradizioni, e scorrendo le tabelle ad esso allegate, è possibile notare come negli ultimi anni siano cambiati i gusti della popolazione italiana; ad esempio si assiste alla progressiva relativizzazione di alcune “grandi invarianti” come la diminuzione del consumo giornaliero di pasta o l'introduzione di alcuni elementi di diversificazione nell'apporto proteico (i prodotti ittici); sono inoltre sempre più apprezzati i piatti pronti (Ready To Eat, vegetali IV e V gamma, oli aromatizzati, condimenti freschi, surgelati, ecc..) non tanto per ragioni di risparmio economico, ma sempre più spesso per un guadagno di tempo. Il 24% del fatturato complessivo dell'industria alimentare proviene da prodotti innovativi o comunque frutto di un'evoluzione.

I cambiamenti dei gusti alimentari negli ultimi anni hanno orientato sempre più i consumi verso prodotti freschi e naturali. L'introduzione di abitudini e specialità culinarie da altri paesi ha portato anche ad un aumento del consumo di prodotti ittici e di pesce crudo.



Fig. 1 - Sushi e sashimi

Alle classiche acciughe marinate che si consumavano prevalentemente nelle aree costiere, si sono aggiunti carpacci o prodotti affumicati a freddo di pesce di specie diverse (pesce spada, salmone, tonno, ecc.) e piatti derivati da culture orientali quali il sushi e il sashimi, che sono sempre più apprezzati dai consumatori italiani.

Il dilagare di ristoranti orientali in genere, ha portato molte pescherie tradizionali, soprattutto nelle grandi metropoli, ad offrire dopo il consueto orario di apertura un servizio di happy hour con prodotti crudi consumati direttamente nelle pescherie stesse.

1.2. Normativa sulla produzione e vendita dei molluschi bivalvi vivi

La produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi, considerati alimenti ad alto rischio, sono disciplinate dal D.L. 530/92. Tale decreto, recependo le raccomandazioni della direttiva CEE 91/492, stabilisce che i molluschi subiscano un destino diversificato in base alla zona di provenienza. Le acque destinate alla mitilicoltura vengono classificate dalle Regioni, attraverso un procedimento ripetuto con scadenza triennale, in tre categorie:

1) zona A: i cui molluschi possono essere raccolti e utilizzati per il consumo umano diretto. Tali molluschi devono soddisfare i seguenti requisiti:

- contenere meno di 300 coliformi fecali o meno di 230 *E. coli* per 100 g di polpa e di liquido intervalvare;
- non contenere salmonelle in 25 g di polpa;
- non contenere sostanze tossiche o nocive di origine naturale o immesse nell'ambiente in quantità tale che l'assunzione tramite alimenti superi la DGA (dose giornaliera ammissibile) per l'uomo;
- avere un tenore massimo di nuclidi radioattivi non superiore ai limiti fissati dalla CEE;

- avere un tenore massimo di biotossine algali PSP (*paralytic shellfish poison*) nelle parti commestibili non superiore a 80 µg per 100 g (misurato mediante metodo biologico);
- non dare, con i metodi di analisi biologica, reazione positiva per la presenza di tossine DSP (*diarrhetic shellfish poison*);
- avere un tenore massimo di ASP (*amnesic shellfish poison*) non superiore ai 20 µg di acido domoico per grammo (metodo di analisi HPLC).

2) *zona B*: i cui molluschi possono essere destinati al consumo umano diretto solo dopo aver subito un trattamento in un centro di depurazione o previa stabulazione in una zona avente i requisiti microbiologici, biologici, chimici e fisici prescritti per la zona A. I molluschi raccolti da tali zone non devono superare i livelli di 6000 coliformi fecali per 100 g di polpa o 4600 *E. coli* per 100 g di polpa nel 90% dei campioni. Mediante depurazione o stabulazione, i molluschi provenienti da tali zone di produzione dovranno arrivare a soddisfare i requisiti fissati per i molluschi delle zone A.

3) *zona C*: i cui molluschi possono essere destinati al consumo umano diretto esclusivamente previa stabulazione, per un periodo non inferiore a due mesi, in una zona avente i requisiti microbiologici, biologici, chimici e fisici prescritti per la zona A; la stabulazione può essere associata o meno ad un processo di depurazione intensivo. I molluschi raccolti da tali zone non devono superare i livelli di 60.000 coliformi fecali per 100 g di polpa. La depurazione, effettuata in centri riconosciuti dal Ministero della Salute, deve consentire ai molluschi di raggiungere i parametri precedentemente citati mediante il rilascio della contaminazione residua. I molluschi devono essere messi nelle condizioni di riprendere rapidamente la nutrizione mediante filtrazione e devono mantenere intatta la loro vitalità. Nel corso del processo di depurazione è possibile utilizzare acqua di mare pulita (o resa tale mediante trattamento) ovvero acqua di mare ricostituita mediante aggiunta dei suoi principali componenti chimici all'acqua potabile. Il processo di depurazione deve essere ininterrotto e deve garantire che lotti diversi di molluschi non si trovino mai a

stabulare nelle medesime vasche nello stesso momento. I centri di depurazione devono garantire il rispetto delle buone pratiche di lavorazione mediante controllo da parte di un laureato in discipline mediche, biologiche o chimiche e devono provvedere ad effettuare i controlli analitici sulle caratteristiche igienico-sanitarie dei molluschi in un laboratorio annesso alla struttura o avvalendosi di un laboratorio esterno riconosciuto dal Ministero della Salute. Successivamente nel Decreto del Ministero della Sanità del 31 luglio 1995 sono state pubblicate le metodiche di analisi per la determinazione nei molluschi bivalvi dei coliformi fecali, di *E. coli*, delle salmonelle e delle biotossine algali.

1.3. I virus enterici nella normativa CE

Tra gli alimenti che in Europa sono considerati oggetto di allerta (sistema RASFF) in quanto responsabili di infezione da Norovirus vi sono sempre più frequentemente i molluschi bivalvi ed i frutti di bosco. Il Regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, G.U. CE n. 338, serie L (2005), considera i virus enterici tra cui i Norovirus, quali patogeni emergenti anche se non vengono ancora inseriti nei piani di controllo ufficiali soprattutto perché gli approcci diagnostici in Europa sono di diversa sensibilità ed è difficile valutare correttamente il rischio di questo tipo di alimento. Indagini condotte da alcuni Istituti Zooprofilattici evidenziano la presenza di Norovirus in molluschi bivalvi allevati in Italia, ma manca un'indagine sulla correlazione con i casi di infezione nell'uomo. Recentemente in Italia l'ISS, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, nell'ambito delle attività del LNR per le contaminazioni virali dei molluschi bivalvi, ha accreditato una metodica in PCR Real time molto sensibile che è stata quindi trasferita agli IZZSS che ora sono in grado di applicarla ai campioni alimentari.

La mancanza a livello nazionale di un sistema organico di sorveglianza delle patologie acute del tratto gastro-enterico, soprattutto a livello pediatrico, non permette una conoscenza completa dell'eziologia italiana circolante sul territorio e l'effettiva prevalenza di infezioni da Norovirus derivante da alimenti.

1.3.1. Direttive e raccomandazioni in merito alla presenza di larve di *Anisakis* spp. nel pesce

L'attuale normativa europea sull'igiene degli alimenti (il cosiddetto Pacchetto igiene) considera il rischio della presenza di parassiti in prodotti ittici e consente il consumo di prodotto fresco solo previo trattamento di bonifica tramite congelamento (-20°C al cuore del prodotto) oppure altri metodi di provata efficacia, come l'affumicatura oltre i 60°C oppure trattamenti di marinatura tali da devitalizzare gli eventuali parassiti presenti (Reg. 853/2004). Negli Stati Uniti le temperature raccomandate dalla Food and Drug Administration (FDA) per devitalizzare le larve sono diverse: -35°C per 15 ore oppure -20°C per 7 giorni.

Nel Reg. 853/ 2004, Sez. VIII, cap. III alla lettera D sono riportati i requisiti relativi ai parassiti:

I prodotti della pesca di seguito precisati devono essere congelati ad una temperatura non superiore a -20°C in ogni parte della massa per almeno 24 ore, il trattamento dev'essere eseguito sul prodotto crudo o sul prodotto finito.

- a) I prodotti della pesca che vanno consumati crudi o praticamente crudi;
- b) I prodotti della pesca a base delle specie seguenti, se devono essere sottoposti ad un trattamento di affumicatura a freddo durante il quale la temperatura all'interno del prodotto non supera i 60°C:
 - i) Aringhe
 - ii) Sgombri
 - iii) Spratti

- iv) Salmone (selvatico) dell'Atlantico e del Pacifico;

Nel Reg. (CE) n. 2074/2005 della Commissione del 5 dicembre 2005 recante modalità di attuazione relative a taluni prodotti di cui al Reg. (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e all'organizzazione di controlli ufficiali a norma dei Reg. del Parlamento europeo e del Consiglio (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004, deroga al regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e modifica dei regolamenti (CE) n. 853/2004 e (CE) n. 854/2004, nell'allegato II, capitolo II prodotti della pesca sono riportate le operazioni per il controllo visivo dei prodotti della pesca dove è possibile la presenza di *Anisakis*:

Controllo Visivo

1. Il controllo visivo è 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. Durante la produzione, il controllo visivo del pesce eviscerato deve essere effettuato da persone qualificate sulla cavità addominale, i fegati e le gonadi destinati al consumo umano. A seconda del metodo di eviscerazione utilizzato, il controllo visivo deve essere eseguito:

- a) in caso di eviscerazione manuale, dall'addetto, in modo continuativo, al momento dell'estrazione dei visceri e del lavaggio;
- b) in caso di eviscerazione meccanica, per campionamento, effettuato su un numero rappresentativo di unità, costituito da almeno dieci esemplari per partita.

2. Il controllo visivo dei filetti o dei tranci di pesce dev'essere effettuato dagli operatori durante la preparazione successiva alla sfilettatura o all'affettatura. Qualora le dimensioni dei filetti o le tecniche di sfilettatura non consentano un controllo individuale, un piano di campionamento deve essere predisposto e tenuto a

disposizione dell'autorità competente, a norma dell'allegato III, sezione VIII, capitolo II, punto 4, del Reg. (CE) n. 853/2004. Qualora sia tecnicamente necessaria, la speratura dei filetti dovrà essere inclusa nel piano di campionamento.

1.3.2. *Anisakis* spp. e la patologia nell'uomo

Anisakis spp. è un nematode il cui ciclo biologico si svolge in ambiente marino, attraverso vari stadi di sviluppo (Esteve C. et al., 2000). Nell'uovo, in acqua, si sviluppa una larva in 1° stadio, che successivamente, al 2° stadio, esce dall'uovo e viene ingerita da un crostaceo planctonico, mutando in larva al 3° stadio. Quando l'ospite definitivo, un cetaceo o un pinnipede, ingerisce a sua volta il crostaceo o dei pesci che abbiano ingerito il crostaceo infestato, la larva subisce l'ultima mutazione e raggiunge lo stadio adulto. Questo parassita adulto vive nello stomaco dell'ospite e produce uova, che immesse di nuovo nell'acqua con le feci danno inizio ad un nuovo ciclo (Manfredi M.T., Genchi C., 1998).

Le forme larvali in 3° stadio si localizzano nel fegato, nel mesentero e nelle gonadi, ma anche nel tessuto muscolare, dove migrano di solito dopo la morte del pesce per motivi non ben specificati e sono responsabili della patologia nell'uomo. Maggiore è la percentuale di grassi del muscolo, maggiore è il numero di larve che vi migrano, sicché i pesci più a rischio sono aringhe, merluzzi, sgombri e sardine. Sono state rilevate larve di *Anisakis* spp. anche nei salmonidi alimentati con pesci marini non controllati e risanati. I pesci di età maggiore sono più infestati, le larve possono sopravvivere nell'ospite per circa 3 anni (Manfredi M.T., Genchi C., 1998).

L'infestazione ha un'alta incidenza con notevole resistenza ad agenti chimici e fisici, tanto che la CEE ha emesso direttive (CEE 91/493) che disciplinano questo aspetto della produzione e commercializzazione dei prodotti della pesca.

L'infestazione umana si verifica per lo più per ingestione di pesci o molluschi crudi o poco cotti, ma anche marinati, affumicati o salati, e quindi soprattutto nei Paesi in cui si hanno tali abitudini alimentari: Giappone, Spagna, Olanda, Paesi sulle coste del

Mar del Nord e dell'Atlantico (Gomez B. et al., 1998). Le larve sono anche piuttosto resistenti ai vari trattamenti (Manfredi M.T., Genchi C., 1998), per cui sono stati segnalati casi insorti dopo ingestione di pesce cotto (Moreno Ancillo A. et al., 1997), e anche il congelamento (Audicana L. et al., 1997), nonostante sia consigliato dalle norme CEE e sia efficace in molti casi, non sempre riesce ad uccidere tutte le larve presenti (Hauck A.K., 1977). Anche con l'uccisione delle larve, gli antigeni di *Anisakis* spp. sono straordinariamente resistenti al congelamento e alla cottura (Audicana L., et al. 1997), e l'esposizione ad essi è in grado di condurre a reazioni di ipersensibilità che vanno dall'orticaria allo shock anafilattico. Le proteine antigeniche (peptidi di p.m. tra 30 e 50 kd) in causa non sono ancora state ben isolate e caratterizzate (Bernardini R. et al., 1998). I parassiti, comunque introdotti nell'organismo, inducono un aumento delle IgE, con reazioni IgE mediate come orticaria, angioedema, anafilassi, asma. Nel paziente è rilevabile sia un aumento delle IgE totali che un aumento delle IgE specifiche verso l'*Anisakis*, con prick test e RAST positivi. Il reperto di una positività delle IgE specifiche anche in una certa percentuale di soggetti asintomatici e in soggetti con orticaria, angioedema o anafilassi, non scatenate da alimenti parassitati, ha portato a ipotizzare che potrebbe esservi una iniziale sensibilizzazione ad *Anisakis* spp., asintomatica, con comparsa di sintomatologia solo dopo nuova esposizione agli allergeni (Bernardini R. et al., 1998). E' stata segnalata anche una reattività crociata tra *Anisakis* e allergeni di un artropode detto Blatella Germanica (Perteguer M.J. et al., 2000).

L'ingestione di pesce, per quanto sia la via attraverso la quale più frequentemente l'uomo viene a contatto con la larva e i suoi antigeni e si ammala, non è l'unica modalità possibile: sono segnalati infatti in letteratura casi in cui è dimostrata una sensibilizzazione all'*Anisakis* spp., con i quadri clinici di cui parleremo più avanti, in seguito ad inalazione di particelle di pesce (Rodriguez J. et al., 1997) o a manipolazione (Purello D'Ambrosio F. et al., 2000) di pesce o farine di pesce infestate. Sono questi chiaramente i casi che più ci interessano, potendosi questa eventualità presentare in lavoratori addetti alla pesca, alla lavorazione e alla rivendita

di pesce fresco o congelato (Purello D'Ambrosio F. et al., 2000) che manipolano pesce spesso infestato e sono esposti perciò ad un rischio di sensibilizzazione forse sottostimato e misconosciuto.

Pochissimi sono infatti ancora gli studi sull'anisakiosi come malattia professionale. Rodriguez et al. hanno segnalato i casi di due addetti alla lavorazione ittica con asma professionale accertata anche con tests di provocazione bronchiale. Armentia et al. hanno segnalato due casi di asma in addetti alla manipolazione di pesce e farina di pesce. Purello et al. hanno studiato un gruppo di pescatori e pescivendoli, rilevando aumentati livelli di IgE totali e specifiche.

Nei rari casi di asma segnalati la diagnosi si è basata sui test cutanei, sui dosaggi delle IgE totali e specifiche, e nei casi citati da Armentia et al. su test di provocazione bronchiale con *Anisakis* spp.; tale ultima metodica ha un margine di rischio e non è perciò proponibile in ambito medico legale.

Parte dei pazienti presentava una sintomatologia addominale dovuta alla presenza di larve in 3° stadio nello stomaco, (con dolori acuti in regione epigastrica, vomito, diarrea), o nell'intestino, con quadri simil-occlusivi (Romeo Ramirez J.A. et al., 1997) o simil-appendicolari, dolore, nausea, vomito, diarrea, febbre, sangue occulto nelle feci.

A livello dello stomaco i parassiti possono essere visualizzati e rimossi tramite endoscopia digestiva (Dominguez Ortega J. et al., 2000), con rapida risoluzione del quadro clinico, l'infestazione può viceversa persistere in forma cronica. All'esame istologico si rileva un'infiltrazione eosinofila della mucosa gastroenterica, con ascessi microscopici e cellule giganti; il quadro radiologico è aspecifico.

1.4. Le alte pressioni idrostatiche (HPP – High Pressure Processing)

Negli ultimi anni l'industria alimentare si è sempre più interessata allo sviluppo di nuove tecnologie volte a produrre alimenti in cui vengono migliorate le caratteristiche nutrizionali, igienico-sanitarie, organolettiche, funzionali e di rispetto ambientale.

Per questo motivo lo sviluppo delle “*mild technology*” (tecniche basate su un uso di blandi trattamenti chimici, fisici o meccanici) ha migliorato notevolmente le condizioni produttive e, di conseguenza, la qualità e la funzionalità dei prodotti, dando vita ad una generazione di beni alimentari definiti “*minimal processed foods*”. Sono state studiate nuove tecnologie alternative ai trattamenti termici, quali l'uso di campi elettrici o magnetici, le microonde, le radiazioni ionizzanti, le alte pressioni idrostatiche, gli agenti chimici (quali l'anidride carbonica), trattamenti con l'ozono e altri ancora (Quaglia, 1993). In particolare la tecnologia delle alte pressioni idrostatiche (HPP - High Pressure Processing) sembra essere quella che, più di tutte, presenta interessanti possibilità applicative: è una tecnica che risponde agli obiettivi di salubrità, genuinità e qualità organolettica dei prodotti alimentari, permettendo inoltre un basso consumo energetico e un facile impiego.

Con l'utilizzo di questa nuova tecnologia vi è l'effettiva possibilità di minimizzare la perdita di nutrienti, aromi e colore perché solo i legami chimici relativamente più deboli vengono modificati dalla pressione applicata.

In molti casi i trattamenti termici di conservazione determinano una serie di modificazioni indesiderate a volte d'entità tale da cambiare radicalmente le caratteristiche originarie dei prodotti.

Lo studio delle cinetiche delle reazioni desiderabili e di quelle dannose ha consentito di utilizzare valori dei parametri di processo tali da massimizzare l'effetto di stabilizzazione e minimizzare gli effetti indesiderati indotti dal trattamento termico.

L'utilizzo per molti anni delle alte pressioni in altri settori come quello delle ceramiche, dei diamanti sintetici, dei metalli (Tab. 1) ha fornito le basi per un trasferimento tecnologico al settore alimentare dove, per la rapida evoluzione dei bisogni e quindi dei consumi, sono richiesti interventi innovativi al fine di mantenere o di migliorare la competitività delle aziende.

Tab. 1 - Storia dello sviluppo degli impianti industriali ad alte pressioni

1949	PRODUZIONE DI DIAMANTI	8000 MPa
1964	COMPRESSIONE POLVERI	da 100 a 500 MPa
1965	ESTRUSIONE IDROSTATICA	1200 MPa
1965	TRATTAMENTO ALIMENTI	da 400 a 1400 MPa

1.4.1. Cenni storici

Già all'inizio del secolo scorso sono stati fatti i primi studi sull'applicazione delle alte pressioni in campo alimentare (Tab. 2).

Tab. 2 - Principali studi sulle alte pressioni in campo biologico

<u>ANNO</u>	<u>AUTORE</u>	<u>ASPETTI STUDIATI</u>
1899	HITE	effetto stabilizzante sui prodotti
1914	BRIDGMAN	denaturazione proteica
1945	JOHNSON	inibizione della crescita dei microrganismi
1950	ZOBELL	sopravvivenza ad alte pressioni dei batteri marini
1970	ZOBELL	condizioni di trattamento, tempo e Pressione
1989	HOOVER	sensibilità dei microrganismi alla Pressione
1992	CHEFTEL	studi sui prodotti e prime produzioni industriali
1993	KNORR	applicabilità nell'industria alimentare
1996	HAYASHI	applicazione in campo alimentare

I primi a studiare le applicazioni delle alte pressioni idrostatiche su materiali biologici furono Hite nel 1899 che espose diversi alimenti e bevande a circa 680 MPa, mentre nel 1914 Bridgman ottenne la coagulazione dell'albume dell'uovo con trattamento iperbarico dimostrando gli effetti denaturanti delle alte pressioni sulle molecole proteiche. Questi ricercatori scoprirono che il trattamento di alcuni alimenti a pressioni comprese fra 400 e 600 MPa, per intervalli di tempo fra 30 e 60 minuti, aumentava la loro conservabilità a causa di una parziale distruzione dei microrganismi contaminanti.

Negli anni successivi venne dedicata poca attenzione all'applicazione delle alte pressioni nel settore alimentare, in quanto l'inattivazione microbica per via termica risultò più semplice e vantaggiosa.

A Hedén si devono numerosi studi sistematici che dimostrano l'effetto delle alte pressioni sulle cinetiche di reazione, mentre Zobell effettuò vari studi sulla flora a diverse profondità dell'oceano, aprendo la ricerca sulle condizioni di sviluppo e di sopravvivenza e sulla sensibilità iperbarica dei vari microrganismi.

La ricerca applicativa delle alte pressioni sui prodotti alimentari inizia alla fine degli anni '80 con lo studio degli effetti di questa tecnologia sulle componenti alimentari, sui microrganismi, sugli enzimi e sulle cinetiche di reazioni enzimatiche.

Negli anni '80 furono pubblicati importanti studi da Morild (1981), Heremans L. (1982), Weber e Drickamer (1983), Balny e Masson (1989) e Kunugi (1989).

Già all'inizio degli anni '90 in Giappone compaiono sul mercato i primi prodotti a base di agrumi e frutta, che suscitano un grande interesse delle industrie alimentari sia in Europa che negli Stati Uniti stimolando la ricerca applicata in questo settore.

Un esempio di prodotti commerciali presenti sul mercato trattati con la tecnica delle alte pressioni sono: succhi d'arancia (Francia), puree di avocado (Texas/Messico), prodotti carnei (Spagna e Grecia) prodotti ittici (Italia).

1.4.2. Trattamenti con le alte pressioni

Intendiamo per “trattamento ad alte pressioni” un processo in cui viene applicata una pressione idrostatica superiore a 200 MPa, per tempi diversi a seconda dell’effetto voluto.

La pressione è, insieme alla temperatura, il fattore che in modo generale e prevalente influenza la resa e la velocità di un processo chimico.

Il campo di pressioni utilizzate nelle operazioni industriali varia da pochi millesimi a qualche migliaia di bar ed è diviso per consuetudine in due intervalli:

⇒ BASSE PRESSIONI (inferiori a 200 MPa);

⇒ ALTE PRESSIONI (superiori a 200 MPa).

In un processo chimico o fisico si ricorre all’uso della pressione per rendere possibile una reazione oppure per renderla più economica. Alcuni processi, per ottenere rese soddisfacenti, possono essere condotte solo in condizioni di elevata pressione. Vi sono inoltre tipi di operazioni di assorbimento che richiedono l’uso di elevate pressioni per aumentare la solubilità dei gas. Infine è possibile condurre in modo economico certe condensazioni solo in pressione.

I principali vantaggi nel campo alimentare di questa tecnica sono:

- uniformità di trattamento dovuta al fatto che la pressione viene esercitata allo stesso modo in tutti i punti del prodotto (Principio di Pascal);
- possibilità di ottenere prodotti in cui le caratteristiche sensoriali e nutrizionali siano molto simili a quelle dell’alimento all’atto del confezionamento, grazie alla possibilità di operare “a freddo” e cioè a temperatura ambiente o a valori notevolmente inferiori a quelli utilizzati nei trattamenti termici tradizionali (Fig. 2);

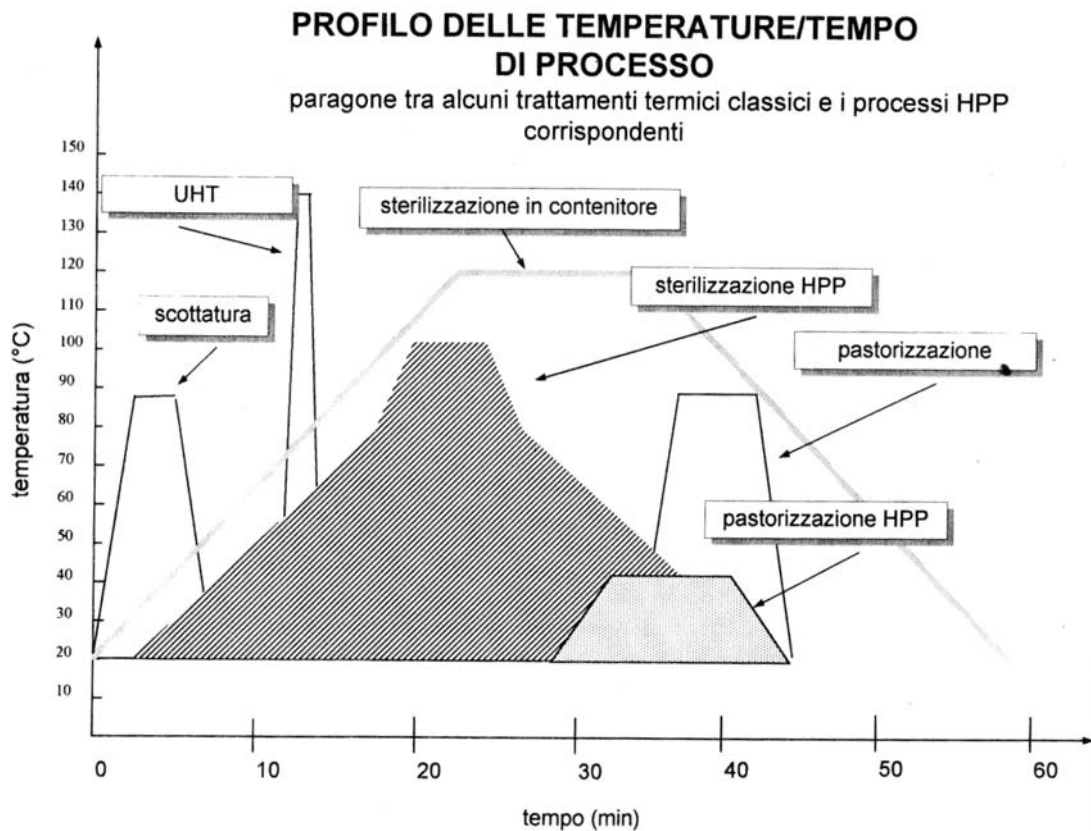


Fig. 2 - Confronto tra processi termici e processi HP (Avure Technologies)

- distruzione dei microrganismi responsabili dell'alterazione di quei prodotti che in alternativa sono generalmente stabilizzati per mezzo della pastorizzazione termica;
- inattivazione dei microrganismi patogeni non sporigeni (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, ecc.);
- risparmi energetici e un trascurabile inquinamento ambientale a paragone delle tecniche di stabilizzazione con il calore normalmente utilizzate;
- prolungamento della shelf-life dei prodotti alimentari (anche per produzioni massive quali il vino e la birra) (Gola S. et al., 1992; Hara G., 1990);

- possibilità di utilizzare packaging non adatti ai trattamenti termici tradizionali (es. film plastici).
- minor impatto ambientale: il trattamento del contenitore avviene infatti insieme al prodotto, con una riduzione dei costi derivanti dall'uso degli impianti di riempimento in asettico.

E' bene considerare che i trattamenti iperbarici possono accelerare o rallentare le reazioni chimiche ed enzimatiche naturalmente presenti. Ad esempio è stato sperimentato che le caratteristiche sensoriali del prodotto possono subire modifiche in seguito a reazioni chimiche ed enzimatiche che iniziano durante la fase di preparazione per essere poi accelerate durante il trattamento sotto pressione (Rovere P. et al., 1994).

L'utilizzo di questa tecnica inoltre comporta alcuni aspetti che è bene considerare:

- il prodotto deve essere preparato utilizzando procedimenti a volte diversi da quelli normalmente usati nei trattamenti di stabilizzazione termica convenzionali;
- i tipi di imballaggi e le modalità nel confezionamento dovranno essere tali da permettere un'ottimizzazione del trattamento;
- occorrono discreti investimenti iniziali, a volte superiori a quelli delle tecniche tradizionali. Quest'importante aspetto orienta la scelta verso particolari alimenti ad alto valore aggiunto che, con un processo tradizionale, perdono facilmente alcune caratteristiche qualitative oppure verso prodotti ad alto valore ove l'impatto percentuale dell'ammortamento della nuova tecnologia risulta minimale;
- i costi degli impianti aumentano in modo quasi lineare con il crescere del livello massimo di pressione a cui possono operare (pressioni inferiori a 500 MPa non sono considerate di interesse commerciale perché necessiterebbero di tempi di processo troppo lunghi). La temperatura del prodotto e del liquido di trasmissione della pressione durante il processo iperbarico influisce in maniera significativa

sia sui livelli di pressione che sui tempi di trattamento. La durata del processo deve essere compatibile con le applicazioni industriali;

- la scelta delle caratteristiche di vita e delle condizioni di temperatura di magazzino del prodotto finito influenzano tutte le operazioni precedentemente descritte.

1.4.3. Meccanismo delle alte pressioni

La legge fisica su cui si basa la tecnologia delle alte pressioni idrostatiche è il principio di Pascal secondo il quale la pressione esercitata su di un fluido si trasmette uniformemente e istantaneamente ad ogni porzione del fluido (quindi anche all'alimento confezionato in esso immerso e alle pareti del contenitore) indipendentemente dal volume e dalla massa del prodotto da trattare (Fig. 3). Non esistono gradienti di pressione all'interno del liquido e del prodotto trattato contrariamente ai gradienti di temperatura che si osservano quando un materiale è riscaldato per conduzione. Secondo il principio di Le Chatelier le alte pressioni favoriscono tutti quei fenomeni con variazioni di volume negativo. Un aumento di pressione a temperatura costante, implica un aumento del grado di ordine delle molecole di una sostanza (Tewari G. et al., 1999).



Fig. 3 Trasmissione della pressione ad un corpo sottoposto a trattamento iperbarico

Le alte pressioni hanno effetto solo sui legami non-covalenti (idrogeno, ionici e idrofobici): questo significa che molecole a basso peso molecolare responsabili delle caratteristiche nutrizionali e sensoriali degli alimenti non sono influenzate; sono invece molto sensibili a questi trattamenti componenti ad alto peso molecolare con una struttura spaziale organizzata proteica o polisaccaridica.

E' noto che le cinetiche di reazione, lo stato fisico e l'equilibrio chimico di sistemi sia semplici che complessi sono influenzati dalla temperatura e dalla pressione. Pertanto al di sopra di alcuni valori di queste variabili (P e T) i trattamenti possono portare ad effetti sia reversibili sia irreversibili.

Negli anni sono stati condotti vari studi utilizzando differenti combinazioni di temperatura, pressione e tempo per poter gestire e valutare i parametri di processo di questa tecnologia. Questo è stato fatto sia per l'aspetto microbiologico che nutrizionale ed enzimatico.

1.4.4. Effetti delle alte pressioni

1.4.4.1. Azione sull'acqua

Considerare l'effetto sull'acqua è importante perché è uno dei componenti principali degli alimenti. All'aumentare della pressione l'acqua subisce una diminuzione di volume del 4% a 1000 atm, dell'11% a 4100 atm, del 15% a 6100 atm, mentre sopra a 1000 atm, si trasforma in ghiaccio a temperatura ambiente. Il punto di fusione del ghiaccio si abbassa all'aumentare della pressione e risulta pari a -5°C a 700 atm e -20°C a 2000 atm. Ciò è spiegato dal fatto che la pressione si oppone all'aumento di volume dovuto alla formazione dei cristalli di ghiaccio (Fig. 4).

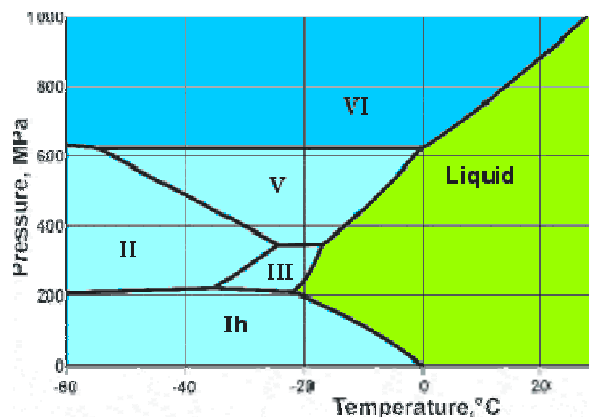


Fig. 4 - Diagramma Pressione e Temperatura dell'acqua sotto pressione

Per capire questo comportamento bisogna tenere presente che, mentre l'acqua pura congelando si dispone secondo un reticolo esagonale regolare, la solidificazione di soluzioni di idrocolloidi porta in genere a strutture distorte e forme cristallografiche dove la simmetria esagonale è quasi scomparsa. Le caratteristiche e le proprietà dell'acqua differiscono notevolmente da quelle di sostanze aventi molecole di dimensioni e massa dello stesso ordine di grandezza. Queste anomalie sono state attribuite all'esistenza di varie forme di aggregazione, in grado di realizzare veri e propri polimeri costituiti da un numero limitato di molecole.

La teoria nota col nome di "flickering cluster theory", ossia "teoria dei grappoli fluttuanti", si basa sul principio che l'energia con cui sono legati due atomi di altrettante molecole mediante legame idrogeno, è funzione della direzione ed è massima quando accettore e donatore sono colineari. Ciascuna molecola d'acqua può partecipare alla formazione di quattro legami idrogeno; questa proprietà rende l'acqua un composto praticamente unico fra tutte le sostanze semplici. In altre parole, l'esistenza dei grappoli può essere considerata una condizione permanente, anche se a nessuna molecola d'acqua in particolare può essere attribuita o negata una maggiore o minore capacità di appartenere a questi gruppi "privilegiati".

L'ipotesi dell'esistenza di due diversi stati dell'acqua, uno a maggior volume molare – e cioè meno denso e strutturato attraverso legami idrogeno – e l'altro proveniente

dalla rottura degli stessi e quindi in possesso di energia più alta con una struttura irregolare e più densa, potrebbe spiegare il massimo di densità mostrato dall'acqua a 4°C. Con l'aumentare della temperatura si verificano due fenomeni opposti: le molecole che costituiscono le regioni ordinate tendono ad allontanarsi provocando una diminuzione del volume molare (quindi un aumento di densità), mentre le molecole libere sono soggette alla normale diminuzione di densità dovuta all'incremento di temperatura. L'ampiezza media dei "grappoli" varierebbe con la temperatura da un massimo di 91 molecole d'acqua in prossimità del punto di congelamento, a 25 intorno ai 70°C; mentre la frazione di molecole non legate da legami idrogeno aumenterebbe rispettivamente da 0,24 a 0,39.

Da ciò si potrebbe desumere che la solidificazione dell'acqua a 0°C avvenga in seguito ad una specie di "saldatura" fra i diversi "grappoli" (Lerici C.R., Lercker G., 1983).

La variazione di pressione indotta dalla tecnologia HPP perturba questo comportamento dell'acqua dando origine a strutture probabilmente disordinate, ma tali da occupare volumi limitati. Ciò comporta una massimizzazione delle interazioni che porta inevitabilmente a situazioni in cui non è possibile raggiungere un reticolo solido e ordinato nonostante le temperature siano inferiori a 0°C o si abbiano degli incrementi di temperatura di 3 – 4°C ogni 100 MPa di aumento della pressione.

Questo porta a due conseguenze pratiche:

- a) Gli alimenti congelati possono essere mantenuti scongelati a temperatura tra 0 e -20°C applicando la pressione;
- b) E' possibile la conservazione degli alimenti senza congelarli a temperatura tra 0 e -20°C sotto pressione. In realtà tale processo, come il congelamento, sfruttando il "salto di pressione" non è applicabile ai fini pratici perché troppo costoso e perché la solidificazione dell'acqua è un processo esotermico ove la quantità di

calorie da sottrarre al sistema sono tali che l'istantaneità della decompressione non concede la possibilità di eseguirlo contemporaneamente. Pertanto l'effetto pratico è una elevata instabilità dei micro cristalli prodotti dal salto di pressione che sono quasi completamente sciolti dal loro stesso calore di cristallizzazione.

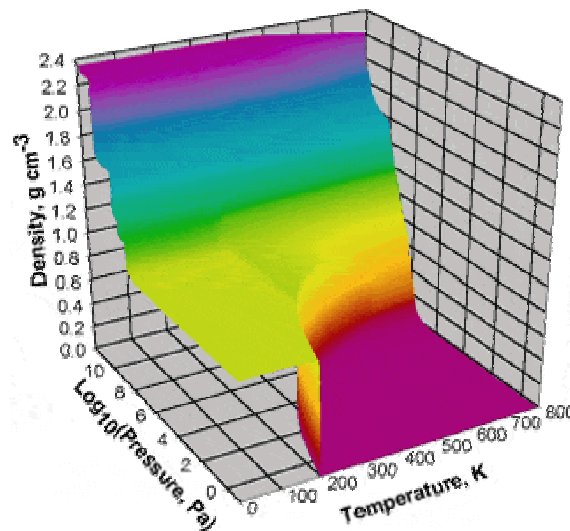


Fig. 5 - Variazione della densità in relazione a Pressione e Temperatura

1.4.4.2. Azione sui microrganismi

Gli effetti delle alte pressioni sulle forme microbiche sono stati studiati in dettaglio per garantire la stabilità microbiologica negli alimenti trattati.

La resistenza dei microrganismi alle alte pressioni è molto variabile. I batteri gram positivi sono più resistenti dei gram negativi (come per la resistenza al calore). Lieviti e muffe sono molto sensibili, mentre le spore batteriche sono presso-resistenti e possono sopravvivere anche a pressioni superiori ai 1000 MPa.

Nel 1989 Hoover dimostrò che la pressione è in grado di determinare cambiamenti alla morfologia cellulare: allungamento delle cellule per schiacciamento, compressione e modificazione di strutture intracellulari, perdita di materiale citoplasmatico e rottura delle cellule (Hoover D.G. et al., 1989).

I batteri *E. coli* 0157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e microrganismi non patogeni sono stati inattivati a pressione di 545 MPa (Raghubeer E. et al., 2000). Non è stata osservata nessuna riduzione del numero di spore a diversi livelli di pressione (massimo livello 827 MPa) applicati a temperature inferiori a 35°C. Utilizzando temperature superiori, si è notato che la riduzione delle spore aumenta (Reddy N.R. et al., 1999).

Spore di *Bacillus stearothermophilus* possono essere inattivate con trattamenti iperbarici, ma solo se abbinati a temperature elevate (intervalli di 60 e 120°C e di 50-600 MPa) (Ananta E. et al., 2001). E' bene considerare che queste temperature sono in ogni caso inferiori a quelle applicate a pressione atmosferica.

1.4.4.3. Azione sui parassiti

Non sono molti gli studi che sino ad ora hanno analizzato l'effetto delle alte pressioni sui parassiti, P. Butz e B. Tauscher hanno testato l'effetto delle alte pressioni sulle larve di nematodi e osservato la loro sopravvivenza a pressioni di 200 MPa a 25°C per 10 minuti, mentre ciò non avveniva a pressioni superiori ai 400 MPa. L'analisi microscopica ha rivelato che la pressione causa alterazioni alla membrana più esterna dei parassiti (Molina Garcia A.D. et al., 2002).

1.4.4.4. Azione sugli enzimi

Le proteine sono caratterizzate da una struttura primaria (sequenza di amminoacidi legati covalentemente), secondaria (peptidi disposti a spirale legati con legami a idrogeno), terziaria (arrangiamenti di catene intro globulari legate da legami non-covalenti), quaternaria (strutture o sub-unità legate da legami non-covalenti). Le alte pressioni possono modificare la struttura secondaria, terziaria e quaternaria alterando la funzionalità delle proteine. Come accennato in precedenza, ciò è dovuto all'azione dell'alta pressione sui legami non-covalenti.

I principali effetti evidenziati sulle proteine dopo trattamento iperbarico sono: gelificazione (Bridgman, 1914), aumento della permeabilità delle membrane (Macdonald, 1992), ionizzazione e precipitazione dei complessi proteici (Timson W.J., Short A.J., 1965).

L'inattivazione enzimatica dipende sia dalle condizioni di processo come temperatura, pressione, pH, presenza di sale, zucchero o additivi, sia dall'enzima preso in considerazione.

I primi studi sono stati eseguiti su enzimi termoresistenti adattati alle alte pressioni (sui fondali marini, in acque calde idrotermali) e hanno portato alla conclusione che molti enzimi termofili presentano anche una maggiore stabilità alle alte pressioni, questa stabilità sembra essere strettamente collegata con la termostabilità dell'enzima anche se la relazione non è ancora ben chiara (Cheftel, 1992).

Gli studi sugli effetti delle alte pressioni nei confronti degli enzimi di importanza tecnologica sono molto discordanti tra loro: di seguito vengono riportati i risultati di alcuni lavori eseguiti da diversi autori.

Un aumento d'attività polifenolossidasi (PPO) è stata riscontrata a seguito del trattamento iperbarico in pere Bartlett (a pressione di 200-500 MPa), mentre per alcuni autori (Knorr, 1993) una pressione di 100-400 MPa porta una diminuzione significativa della PPO nelle patate.

Con cromatografia Sephadex si sono osservati cambiamenti nelle dimensioni molecolari della Tyrosinasi estratta da fungo dopo trattamento; sembrerebbe che il processo HPP porti alla formazione di alcuni aggregati ad alto peso molecolare (Gomez B. et al., 1998).

Altri studi hanno mostrato che l'applicazione delle HPP porta a modifiche conformazionali nella struttura secondaria con formazione di aggregati ad alto peso molecolare. La struttura del sito attivo di questi è tale da diminuire o aumentare l'attività di molti enzimi (Heremans L., 1982; Weber, Drickamer, 1983).

Alcuni autori hanno riscontrato che in determinate condizioni la pressione induce dissociazione e/o denaturazione reversibile degli enzimi. Quando viene rilasciata la

pressione il processo di rinaturazione può essere lento e contemporaneamente può avvenire anche isteresi (Defaye A.B. et al., 1995; Silvia J.L. et al., 1993).

E' stata riscontrata un'attivazione della perossidasi (PO) in triturato di pomodoro se trattato a pressioni inferiori a 350 MPa e a pressioni superiori ai 500 MPa a temperatura ambiente (20°C). L'attivazione sembra dovuta ad una maggiore solubilizzazione da parte della pressione dell'enzima legato alle membrane cellulari (lo stesso andamento è stato visto per la PO e la PE in purea di pomodoro), (Almudena H., Cano M.P., 1998; Rovere P. et al., 1997).

Gli stessi effetti sulla PO sono stati riscontrati in mele: l'aumento dell'attività è stato imputato ad una maggiore estraibilità dell'enzima (Prèstamo G. et al., 2001). Quest'effetto non è stato osservato con l'enzima puro, dove l'attività diminuisce con l'aumento della pressione.

In alcuni casi la combinazione HP/temperatura ha portato ad effetti di attivazione che da alcuni autori vengono attribuiti a configurazioni reversibili e/o cambi conformazionali delle molecole di substrato (Anese M. et al., 1994).

Cano M.P. et al. (1997), al contrario hanno trovato che anche a pressioni relativamente basse (280 MPa, 45°C o 400 MPa 32°C) l'attività perossidasi in purea di fragole e succo d'arancia viene ridotta.

Matser A.M. et al. (2000), hanno notato un'attivazione della PPO da fungo dopo trattamento a 600 MPa. In questo caso è stato ipotizzato un meccanismo di attivazione dovuto a cambiamenti conformazionali dell'enzima escludendo una maggiore solubilizzazione; questo poiché la PPO nel fungo non è legata alle membrane ma si trova in zona extracellulare.

A pressioni più alte l'attività enzimatica viene ridotta ma non l'imbrunimento del fungo. Questo è probabilmente causato da un aumento della permeabilità della membrana dovuta al trattamento con le alte pressioni che portano ad una cristallizzazione dei fosfolipidi delle membrane cellulari con aumento delle interazioni tra fenoli intracellulari e PPO extracellulare.

Una diminuzione dell'attività pectinesterasica è stata vista da alcuni autori (Van den Broeck I. et al., 1999) nell'arancia trattata a pressioni superiori ai 600 MPa.

Con un trattamento di 600 MPa si è ottenuta solo una parziale inattivazione della PE e della PPO in purea di guava (Gow-Chin Y., Hsin-Tang L., 1996).

Castellari M. et al. (1997) hanno inattivato la PPO del mosto solo a pressioni superiori a 600 MPa o abbinando alla pressione temperature dai 40 ai 50°C.

1.4.4.5. Azione su colore, struttura e consistenza

Carotenoidi, clorofilla e antociani sembrano essere resistenti alla pressurizzazione (Cheftel, 1992), mentre consistenza e texture sono modificate dal trattamento.

In pezzi di fragola trattati a 500 Mpa le componenti antocianiche e il colore risultano essere modificati in maniera molto limitata (Carpi G. et al., 1996).

All'aumentare della pressione l'indice Bostwick in triturato di pomodoro diminuisce regolarmente perchè il prodotto diventa sensibilmente più viscoso (Rovere P. et al., 1994)

La frutta intera viene destrutturata irreversibilmente a causa della scarsa comprimibilità dei gas contenuti all'interno; ciò è molto meno evidente nella frutta in pezzi (Cheftel, 1992).

1.4.5. Le alte pressioni nel settore alimentare

La pressione è l'unico sforzo presente in un fluido in quiete (legge di Pascal): agisce normalmente su una superficie immersa nel fluido stesso e viene anche definita come "pressione idrostatica" (Cocchi, 1990).

Il principio su cui si basa l'applicazione delle HHP nell'industria alimentare è quello di esporre ad alte pressioni l'alimento, che può essere confezionato o non confezionato.

Se il trattamento dell'alimento avviene tramite un mezzo di trasmissione fluido si dice "indiretto" (nel nostro caso acqua); altrimenti in alternativa il trattamento può essere ottenuto mediante una pompa idraulica a "pistone flottante" che agisce direttamente sul prodotto e allora viene detto "diretto" (non utilizzato a livello industriale).



Fig. 6 - Impianto per il trattamento con alta pressione QFP 350L-600 High Pressure Processing System (Avure Technologies)

L'applicazione delle alte pressioni agli alimenti si propone quale valida alternativa ai processi di stabilizzazione alimentare convenzionali; infatti i prodotti trattati HPP risultano essere di alta qualità, con caratteristiche organolettiche e nutrizionali simili al prodotto fresco, sicuri da un punto di vista microbiologico e con aumentata shelf-life rispetto ai prodotti non trattati termicamente e commercializzati come refrigerati.

1.4.6. Prospettive future

Considerando i risultati ottenuti dalla sperimentazione delle tecnologie HPP in campo alimentare, le potenzialità d'impiego delle alte pressioni riguardano:

- prodotti per i quali è richiesta una garanzia sanitaria e un aumento della shelf-life;
- prodotti da stabilizzare dal punto di vista microbiologico a seguito di particolari normative che potrebbero limitare il mercato di prodotti tradizionali, es. salumi per la cui esportazione è richiesta l'assenza di *L. monocitogenes*;
- prodotti al passo con le nuove tendenze di mercato: semiconserve o conserve a cui viene aggiunto un contenuto di servizio. Per la preparazione di questi prodotti alla tecnica delle alte pressioni vengono accoppiati altri mezzi necessari a raggiungere una determinata shelf-life come l'atmosfera modificata o un packaging con particolari proprietà barriera.

Nonostante sia ancora alto il costo d'investimento, negli ultimi anni si è visto un notevole aumento di installazioni di impianti HPP anche in Europa, sempre per prodotti con un alto valore aggiunto (carne, prodotti ittici) o con un alto contenuto di servizio (RTE) (Fig. 7).



Fig. 7 – Esempi di prodotti ittici trattati con HPP

2. SCOPO DELLA TESI DI DOTTORATO

2.1. Obiettivo della tesi

I prodotti della pesca rappresentano una categoria di alimenti molto ampia il cui consumo è in continua crescita, specialmente per quelli provenienti da allevamenti. Tali prodotti possono costituire un serio problema per la salute pubblica in quanto potenziale veicolo di microrganismi patogeni, virus enterici, nematodi e contaminanti chimici presenti nell'ambiente in cui vivono.

Lo scopo di questa tesi di dottorato è quello di investigare l'applicazione di una nuova tecnologia che permetta di inattivare virus enterici e nematodi in prodotti della pesca destinati ad essere consumati crudi.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Materiali

3.1.1. Materie prime

3.1.1.1. Sgombri

Per poter disporre di un certo numero di larve di *Anisakis*, sono stati scelti sgombri (*Scomber scombrus*) di provenienza del Mar del Nord (Norvegia), in genere specie parassitata in alta percentuale (Fig. 8). I pesci sono stati recapitati al laboratorio 48 ore dopo la pesca, freschi e refrigerati in cassette di polistirolo con ghiaccio in scaglie.



Fig. 8 - Sgombri (*Scomber scombrus*) del Mar del Nord

3.1.1.2. Vongole veraci e Norovirus

La ricerca è stata condotta su 200 vongole veraci (Fig.9) raccolte in aprile 2010 in laguna di Scardovari (Ro), nel Delta del Po, sono state messe in una vasca con 100 lt di acqua con salinità del 3,5% a 15°C e con il 90% di ossigeno disciolto. Le vongole non sono state depurate per ridurre al minimo lo stress di adattamento all'ambiente artificiale e non comprometterne le capacità filtratorie. Dopo 24 ore di acclimatamento l'acqua della vasca è stata contaminata con MNV-1 in modo da ottenere un titolo finale in acqua pari a 4 log TCID₅₀ ml⁻¹. Le vongole, del peso medio di 10 g ciascuna, sono state lasciate 24 ore in acqua contaminata.



Fig. 9 - Vongole veraci

3.1.2. Termosaldatrice

Entrambi i campioni (sgombri e molluschi bivalvi) sono stati confezionati prima del trattamento iperbarico in buste plastiche sotto vuoto e termosaldare (Fig.10). Nel caso dei molluschi è stata aggiunta una soluzione a 3.5% di NaCl prima della chiusura delle buste.



Fig. 10 - Confezionamento s/v degli sgombri

3.1.3. Impianto HPP

Gli studi sono stati condotti utilizzando un'autoclave ad alta pressione QUINTUS[®] FOOD PRESS 35L-600 con volume utile di 35 litri capace di raggiungere 6000 bar (Fig. 11).



Fig. 11 - Autoclave ad alta pressione QUINTUS[®] FOOD PRESS 35L-600 (Avure Technologies)

L'autoclave QFP 35L-600 può lavorare, a seconda della tipologia dell'alimento, fino a 320 kg di prodotto per ora. Escludendo il tempo di mantenimento alla pressione di 600 MPa, un ciclo completo che comprende le operazioni di carico e scarico, il raggiungimento della pressione e la depressurizzazione ha una durata di circa 5 minuti. L'autoclave può operare da 4 a 90°C e raggiungere al massimo una pressione di 6000 bar; durante il ciclo è possibile misurare e registrare i parametri di processo grazie a termocoppie e a un trasduttore di pressione.

La camera che contiene l'alimento confezionato deve resistere alle alte pressioni ed è generalmente costituita da strutture composite di più cilindri concentrici in acciaio.

Un'autoclave HPP deve essere in grado di sopportare le notevoli sollecitazioni meccaniche dovute alle elevate pressioni raggiunte durante il processo. Per questo i costruttori d'impianti HPP realizzano le loro attrezzature in modo che il cilindro in pressione abbia delle chiusure alle estremità che possano scorrere assialmente. La spinta delle chiusure è trasmessa poi ad una struttura esterna. In questo modo il cilindro può resistere alle spinte assiali.

Sia il cilindro che la struttura esterna sono generalmente precompressi mediante avvolgimenti di piattina d'acciaio pretensionata e rimangono leggermente in compressione anche quando all'interno dell'autoclave si sviluppa la massima spinta. Questo previene la rottura per fatica del telaio e del cilindro. Inoltre la particolare conformazione multistrato previene il propagarsi di un'eventuale cricca passante (Fig.12) (Zimmerman, Bergman, 1993).

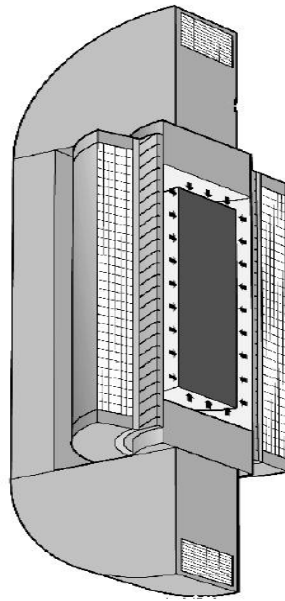


Fig. 12 - Sezione della camera di pressione in un impianto HPP (Avure Technologies)

Le principali componenti dell'autoclave QFP 35L-600 (in figura 13 vengono indicate le parti mobili) sono:

- piastra di pressione [1];
- chiusure superiore [2] ed inferiore del cilindro di compressione;
- intelaiatura dell'autoclave (*frame*)[3];
- cilindro di compressione (*vessel*);
- sistema di gestione delle acque di processo (*tank*);
- cesta forata per il caricamento dei campioni confezionati (*basket*);
- valvola di decompressione;
- intensificatore di pressione 7X.

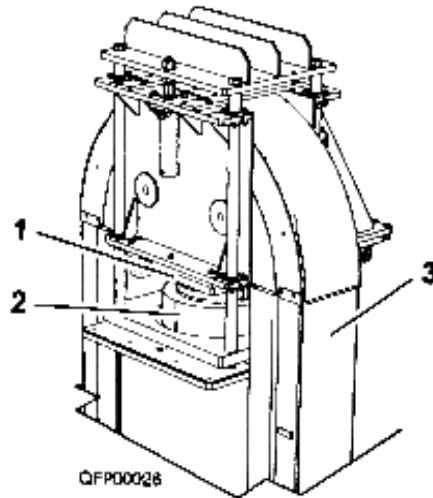


Fig. 13 - Parti mobili dell'autoclave (Avure Technologies)

Si possono impostare e quindi controllare i valori di pressione, tempo e temperatura del trattamento.

Gli alimenti confezionati in contenitori flessibili termosaldati sono posti nell'apposita cesta forata (Fig.14) e, mediante un sistema di caricamento a braccio mobile, sono introdotti all'interno del cilindro di compressione (Fig.15); dopo il trattamento lo stesso sistema provvede allo scarico della cesta.



Fig. 14 - Cesta per il trattamento dei campioni

La cesta è forata per permettere un agevole inserimento ed estrazione della stessa all'interno dell'autoclave anche in presenza di acqua di processo residua; ciò consente di semplificare il lavoro dell'operatore e/o del braccio meccanico di sollevamento.

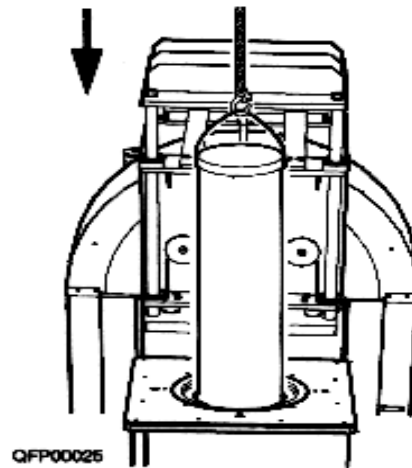


Fig. 15 - Sistema di caricamento a braccio mobile (Avure Technologies)

Il ciclo di trattamento prevede:

1) Chiusura dell'autoclave:

Consiste nel posizionamento della chiusura superiore e del telaio in asse con il cilindro (Fig. 16).

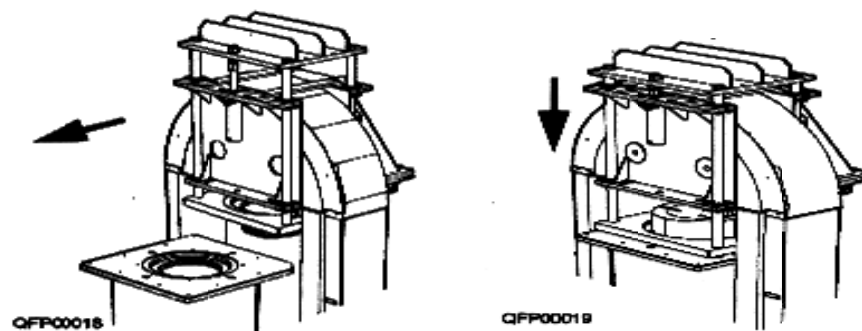


Fig. 16 - Operazioni di chiusura dell'autoclave (Avure Technologies)

2) Riempimento:

Il sistema di gestione delle acque provvede a colmare e pressurizzare (1-2 bar) la camera interna al cilindro con acqua. La temperatura dell'acqua può essere definita in modo tale da consentire di mantenere costante quella di trattamento.

3) Pressurizzazione:

La pompa munita di intensificatore 7X porta la pressione da 1-2 bar al valore predefinito dall'operatore.

4) Mantenimento:

Durante questa fase la pressione è mantenuta a valori costanti per il tempo predefinito. Se durante il tempo di tenuta della pressione il livello di quest'ultima diminuisce dell'1% rispetto al valore prefissato, la pompa ricomincia a funzionare e la pressione aumenta fino al livello prestabilito.

5) Decompressione:

La valvola di decompressione viene aperta e la pressione viene dissipata attraverso la laminazione del fluido in un serbatoio pieno d'acqua.

6) Apertura dell'autoclave:

La piastra di pressione si muove verso la posizione più esterna [1], poi la chiusura superiore si alza verso la posizione limite [2] ed infine l'intelaiatura dell'autoclave si sposta all'indietro allontanandosi dal cilindro di compressione fino alla posizione più esterna [3] (Fig. 17).

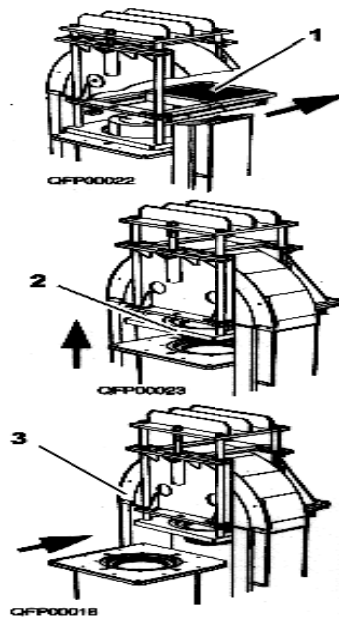


Fig. 17 - Operazioni di apertura dell'autoclave (Avure Technologies)

L'acqua è drenata dal fondo dopo ogni ciclo e nuova acqua è aggiunta durante il ciclo successivo.

3.2. Metodi analitici

3.2.1. Ricerca di larve di *Anisakis* spp. mediante metodo della dissezione autoptica

Scopo e campo di applicazione

La presente procedura descrive le modalità per la ricerca e l'identificazione di larve di nematodi di *Anisakis* spp. in prodotti ittici.

L'identificazione di specie può essere eseguita su:

- campioni di pesci e cefalopodi freschi,
- semiconserve marinate a base di pesce azzurro,
- pesce affumicato

L'analisi è basata sul metodo dell'ispezione autoptica e successiva identificazione del genere.

Gli stadi larvali dei nematodi appartenenti alla famiglia Anisakidae rappresentano un potenziale rischio per la salute umana in seguito al consumo di pesci marini o molluschi cefalopodi parassitati crudi o poco cotti.

I generi *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum*, *Phocascaris* sono patogeni mentre il genere *Hysterothylacium* viene al momento considerato non patogeno per l'uomo.

I prodotti ittici più frequentemente parassitati sono: sardine, aringhe, acciughe, sgombri, suri, merlani, naselli e merluzzi, spratti, triglie, salmoni selvatici, rane pescatrici, pesci sciabola, pesci S.Pietro, totani, calamari, seppie.

Definizioni

Anisakis, *Pseudoterranova*, *Contracaecum*, *Phocascaris* e *Hysterothylacium* sono generi di nematodi appartenenti alla famiglia Anisakidae.

Attrezzature, strumenti, accessori

- Guanti antigraffio, guanti antitaglio in kevlar, guanti monouso ed eventuali sottoguanti.
- Pinze e forbici
- Vaschette di plastica o acciaio inox

- Piastre Petri di 9 cm di diametro
- Vetrini e relativi coprioggetto
- Microscopio ottico 100 X
- Stereomicroscopio 16 X
- Frigorifero + 4°C
- Congelatore – 20 °C
- Dispositivi di protezione individuale

Reagenti e soluzioni

- Sol. fisiologica (0,85 g NaCl per 100 ml acqua distillata)
- Lattofenolo di Amman
- Alcool-glicerolo (9 parti etanolo 70%, 1 parte glicerolo)

Modalità operative

Dissezione autoptica del campione

Incidere la cute del pesce fino a mettere in evidenza gli organi interni. Le larve si localizzano in cavità celomatica, sulle sierose di fegato, ovaio, stomaco e intestino, dove tendono a incistarsi e assumere una caratteristica forma a spirale. Tutte le larve osservate vanno contate, a eccezione delle infestazioni con più di 100 larve per soggetto, che vanno riportate come infestazioni massive.

In caso di valutazione di semiconserve ittiche, esaminare accuratamente la superficie del filetto.

Valutazione della vitalità delle larve

Prelevare delicatamente con una pinzetta la larva e metterla in una piastra Petri contenente soluzione fisiologica a temperatura ambiente. La larva appare vitale quando tende a muoversi spontaneamente, in genere con movimenti di arrotolamento

e srotolamento oppure tende a reagire ad uno stimolo tattile. Per meglio apprezzare i movimenti delle larve osservare allo stereomicroscopio (ingr. 16 X).

Determinazione del genere

Verificata la vitalità della larva, immergere la stessa per 5 minuti in un'altra piastra Petri contenente lattofenolo di Amman per rendere la cuticola esterna più trasparente. Trasferire quindi la larva su un vetrino, aggiungere una goccia di soluzione fisiologica e coprire con un coprioggetto. Identificare secondo le chiavi identificative, valutando la posizione del ventricolo, dell'appendice ciecale, ventricolare e del poro escretore. Le larve del genere *Contracaecum* e *Phocascaris* sono simili e non distinguibili al microscopio ottico.

La larve del genere *Anisakis* e *Hysterothylacium* appaiono di colore biancastro, *Pseudoterranova* appare di colore marrone-rosso, *Contracaecum* e *Phocascaris* appaiono di colore marrone-verde.

La lunghezza delle larve di *Anisakis* spp. varia da 1 fino 3-4 centimetri.

Conservazione delle larve

Immergere le larve in provette di vetro contenenti una soluzione di alcool e glicerina e conservare a temperatura ambiente.

Espressione dei risultati

Il risultato dovrà contenere le seguenti informazioni riferite ad ogni singolo soggetto esaminato: numero e genere di larve, presenza o meno di vitalità.

Es. n. 1) Presenza n.10 larve del genere *Anisakis* (o altri generi), n. 5 larve vitali.

Es. n. 2) Presenza n. 3 larve del genere *Anisakis* (o altri generi), larve vitali assenti.

Es. n. 3) Infestazione massiva, genere *Anisakis* (o altri generi) presenza/assenza di larve vitali.

3.2.2. Ricerca di larve di *Anisakis* spp. mediante metodica di Baermann

La seguente metodica è derivata da quella utilizzata nella ricerca di Strongili Bronco Polmonari mediante metodica di Baermann nelle feci fresche in particolare di ruminanti domestici e selvatici, ma anche in altri animali (suidi, carnivori).

Scopo e campo di applicazione

L'utilizzo della metodica di Baermann permette di evidenziare la presenza di forme larvali di nematodi. Il metodo sfrutta l'idrotropismo, il fototropismo e la mobilità delle larve di nematodi, che ne permette la migrazione dalla massa e la concentrazione sul fondo dell'apparato di Baermann. La ricerca di larve può essere fatta su singolo campione o su pool di feci. La stessa metodica può essere applicata anche su altre matrici (terreno, lettiera, foraggi) per l'estrazione di larve vitali di nematodi.

Apparato di Baermann: sistema costituito da un imbuto (meglio in plastica) sostenuto da un anello porta-imbuto fissato ad un'asta verticale metallica, con il cono prolungato in basso da un tubetto in gomma al quale viene collegato un cilindro di vetro (vedi Fig.18)



Fig. 18 - Apparato di Baermann

Attrezzature, strumenti, accessori

- Piedistallo metallico
- Anelli portaimbuto
- Imbuto di plastica
- Tubo di gomma
- Provettoni da 30 ml o pinza stringitubo a molla
- Telo di cotone
- Reticella metallica
- Mortaio – pestello
- Cucchiaino
- Piastra Petri in plastica con griglia
- Stereomicroscopio con ingrandimento 20-30 X, 10-40 X
- Dispositivi di protezione individuale

Modalità operative

Preparazione dell'apparato di Baermann

Preparare un imbuto di plastica ed un anello portaimbuto per ogni campione (e/o pool di campioni) da esaminare. Fissare gli anelli portaimbuto all'asta metallica in posizione simmetrica. Dopo aver sistemato gli imbuti sugli anelli, fissare al di sopra la retina metallica e collegare al cono il tubo di gomma con il provettone in vetro. In alternativa al provettone è possibile chiudere il tubo di gomma con una pinza stringitubo a molla. Tagliare un quadrato di stoffa (cotone) delle dimensioni sufficienti a coprire la griglia metallica e sistemarlo sulla retina.

Fasi operative della prova

- Porre le interiora in esame sulla retina con il telo di cotone nell'imbuto.
- Aggiungere acqua fino a sommergere le interiora e coprire con carta stagnola.
- Lasciare tutta la notte a temperatura ambiente.
- Trascorse 12-24 ore staccare il provettone dall'imbuto, versare il contenuto in una capsula Petri con griglia ed osservare il materiale allo stereomicroscopio con ingrandimento 20-30 X seguendo la griglia in senso orizzontale o verticale al fine di osservare tutto il contenuto
- Nel caso si voglia procedere all'identificazione delle larve, occorre prelevarle con un ago sottile o una pipetta e porle su un vetrino portaoggetti, coprire con coprioggetto ed osservare al microscopio ottico (10-40 X) Nel caso non sia possibile procedere ad una lettura immediata, il provettone deve essere chiuso e conservato in frigorifero fino a 24 ore per mantenere la vitalità delle larve.

Risultato qualitativo

- Il campione viene considerato "positivo" se si evidenzia la presenza anche di una sola larva, in genere viva e vitale.
- Il campione viene considerato "negativo" se non si evidenzia la presenza di alcuna larva.

3.2.3. Ricerca di virus: saggio col metodo delle placche

La ricerca del virus è stata condotta sulla ghiandola digestiva dei molluschi bivalvi indicata come organo d'elezione per la concentrazione del Norovirus nei molluschi (Le Guyader F.S. et al., 2006). Il ceppo di MNV-1 è stato gentilmente fornito dal Prof. H. W. Virgin, della Washington University School of Medicine, MO, USA. Le linee cellulari: RAW 264.7. Il numero di unità formanti placca (PFU)/ml, è stato determinato con il metodo proposto da Wobus C.E. et al., 2004.

L'estrazione virale è stata eseguita secondo la procedura proposta da Baert L. et al. nel 2008. La prova è stata ripetuta 3 volte a distanza di 8 giorni ciascuna.

Saggio col metodo delle placche

Il saggio con il metodo delle placche si basa sulla limitazione della diffusione del virus dalle cellule inizialmente infette, in modo che si infettino soltanto le cellule adiacenti. Il focus di cellule morte prodotto è reso macroscopicamente visibile mediante colorazione. In pratica, si usa un colore vitale, come il rosso neutro, per colorare le cellule viventi; la placca spicca come un'area pallida.

Vengono impiegate due varianti della tecnica. Nella prima si infetta un monostrato cellulare con virus e lo si ricopre con un terreno di mantenimento contenente agar nutritivo. Le placche si osservano poi dopo un periodo di incubazione. Questa tecnica è applicabile a qualsiasi tipo di cellula capace di dare monostrati in coltura ed è quella più comunemente utilizzata. La seconda è applicabile a quelle cellule che non si moltiplicano facilmente *in vitro*. In questa tecnica, le cellule vengono infettate con il virus quando sono in sospensione. Si aggiunge quindi l'agar alla sospensione infetta e si versa la miscela sopra un sottostrato di agar nutritivo. L'incubazione si effettua come nel primo metodo.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. *Anisakis*

I generi della famiglia Anisakidae attualmente implicati in casi di infezione nell'uomo sono: *Anisakis*, *Pseudoterranova* (*Phocanema*, *Terranova*) e *Contracaecum* (Fig. 19). Il genere *Hysterothylacium* (*Thynnascaris*), di dimostrata patogenicità per il topo ed il macaco a seguito di infezione sperimentale, a tutt'oggi non è stato segnalato nell'uomo (Overstreet R.N., Meyer G.W., 1981; Gonzalez L., 1998).

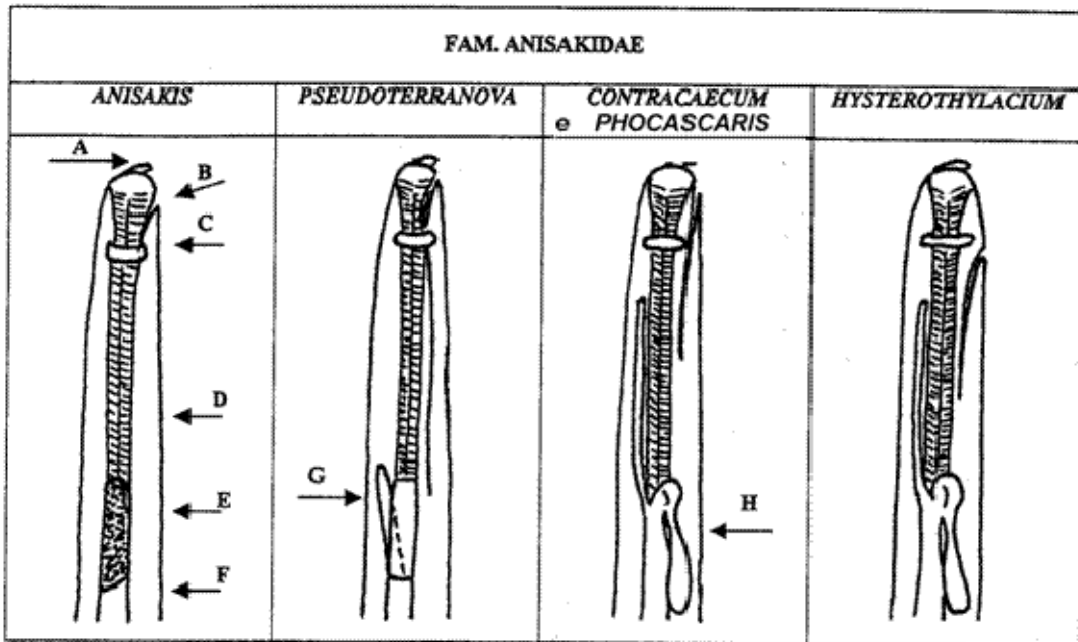


Fig. 19 - I generi della famiglia Anisakidae

A: denticolo craniale; B: poro escretore; C: anello nervoso; D: esofago; E: ventricolo; F: intestino; G: appendice ciecale; H: appendice ventricolare.

Di questi il primo genere è senza dubbio il più pericoloso per il consumatore di pesce italiano in quanto presente in numerose specie ittiche (Panebianco A., Lo Schiavo A., 1985; Orecchia P. et al., 1989; Fioravanti M.L. et al., 1996; Fioravanti M.L. et al., 2003). I prodotti ittici più frequentemente parassitati da *Anisakis* nei mari Italiani sono: sardine, merlani, suri, acciughe, sgombri, merluzzi, rane pescatrici, pesci

S.Pietro e pesci sciabola. Sono anche segnalate presenze in cefalopodi, come le seppie (Giuffrida A. et al., 2002).

Il genere *Anisakis* è denominato Herring-worm in inglese per il fatto che il primo caso documentato nell'uomo, avvenuto a Rotterdam nel 1955, era stato causato dal consumo di aringhe parassitate (Van Thiel P.H. et al., 1960).

Il parassita adulto vive nello stomaco di vari cetacei (balene, delfini, ecc.). Da questi, vengono eliminate attraverso le feci le uova da cui si sviluppano le larve di secondo stadio che infestano piccoli crostacei marini: copepodidi, anfipodi ed euphasidi (krill), divenendo larve di terzo stadio (L-3). Quando i crostacei vengono ingeriti dall'ospite definitivo, la larva diventa di quarto stadio, ed il ciclo ricomincia. Pesci e cefalopodi che si cibano dei crostacei possono fungere da ospiti intermedi, dove la larva rimane di terzo stadio e tende a migrare in cavità celomatica. L'uomo che si ciba di pesci infestati da larve L-3 (colore biancastro, 18-36 mm di lunghezza, 0,2-0,6 mm di larghezza) si comporta da ospite accidentale, a fondo cieco, dove la larva di terzo stadio non si sviluppa ulteriormente e può rimanere per un certo tempo vitale nell'apparato digerente (Fig. 20).

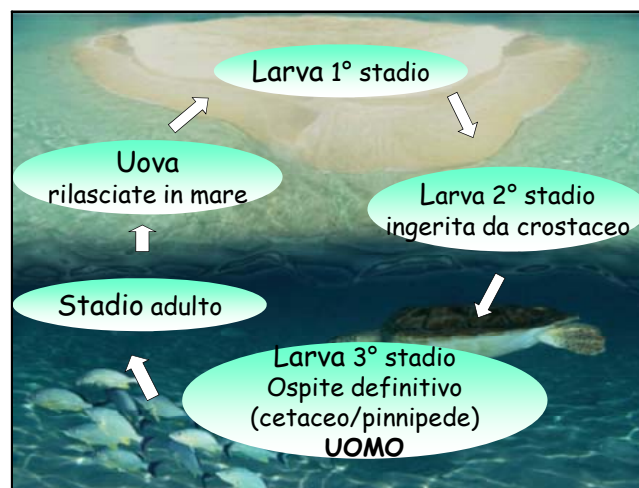


Fig. 20 - Ciclo vitale di *Anisakis*

Una volta ingerita, la larva spesso muore o non dà sintomi. In alcuni casi però, soprattutto se vengono ingerite più larve, queste possono invadere la mucosa gastrica o intestinale e causare dolori addominali, nausea, vomito ed occasionalmente febbre. Una volta penetrata nella mucosa ne deriva una reazione infiammatoria che esita nella formazione di un granuloma eosinofilo che può evolvere in infiammazione di tipo flemmonoso, con possibilità di ulcerazione della mucosa, fino a perforazione della parete (Panebianco A., Lo Schiavo A., 1985).

Sono anche descritti casi di reazioni allergiche a seguito di ingestione di larve di *Anisakis*, con episodi anafilattici con orticaria ed angioedema (Lopez Serrano M.C. et al., 2000; Perteguer M.J. et al., 2000). È stato dimostrato che la ghiandola escrettrice dell'*Anisakis* è un potente allergene, implicato nella stimolazione di anticorpi IgE nell'uomo (Moneo I. et al., 2000).

Anche in Italia sono stati segnalati casi sporadici di infezione da *Anisakis* a seguito di consumo di pesce crudo, crostacei ed acciughe marinate (Maggi P. et al., 2000; Pampiglione S. et al., 2002; Caramello P. et al., 2003).

4.2. Trattamento HPP di sgombri

Sono stati sottoposti a trattamento con HHP sia larve isolate dai pesci, sia pesci interi non eviscerati, mediante tre diversi cicli a pressioni differenti: 100-200-300 MPa per la durata di 5 minuti per ciascun trattamento, a temperatura controllata (circa a 20°C) (Fig. 21).

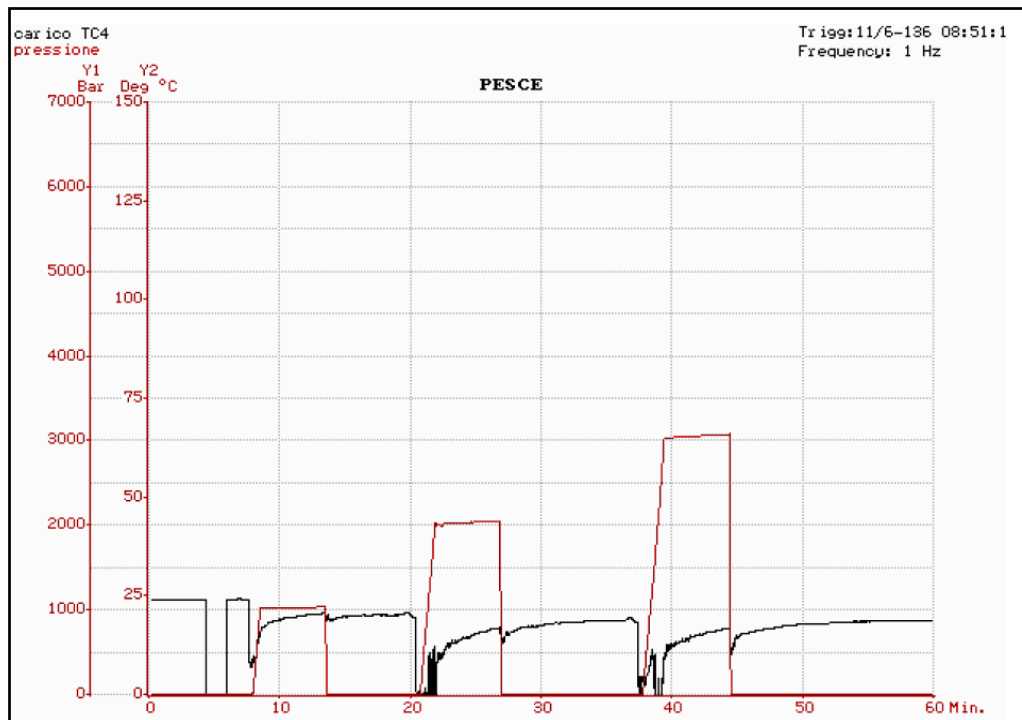


Fig. 21 - Tracciati dei tre cicli HHP impiegati.

Dagli sgombri sono state isolate 120 larve vitali di *Anisakis*, così suddivise:

- 60 larve sono state mantenute in liquido di Eagle addizionato con 20% di siero bovino (Dziekońska Rynko J. et al., 2002), a 6°C al buio per verificare la vitalità nei due giorni successivi; (Tab. 6)
- 60 larve sono state poste in tre confezioni di polipropilene (PP), 20 larve per confezione, assieme al liquido di mantenimento, e sottoposte ai tre diversi trattamenti con HPP.

Quindici sgombri in totale, interi e non eviscerati, sono stati sottoposti a trattamento con HPP, cinque pesci per ogni valore di pressione applicata, immessi in sacchetti singoli di PP e confezionati sottovuoto.

La prova è stata ripetuta dopo 15 giorni su un'altra partita di sgombri della stessa provenienza (Tab. 3).

Tab. 3 - Vitalità delle larve isolate e trattate con HPP

	100 MPa – 5 min		200 MPa – 5 min		300 MPa – 5 min	
	1° prova	2° prova	1° prova	2° prova	1° prova	2° prova
Larve vitali	18	20	0	0	0	0
Larve non vitali	2	0	20	20	20	20

La ricerca delle larve è stata fatta mediante esame ispettivo dei visceri e della cavità celomatica (Tab. 4).

Tab. 4 - Vitalità delle larve presenti nel pesce infestato trattato: esame ispettivo dei visceri e della cavità celomatica

	100 MPa – 5 min		200 MPa – 5 min		300 MPa – 5 min	
	1° prova	2° prova	1° prova	2° prova	1° prova	2° prova
Larve presenti	23	91	34	124	56	126
Larve vitali	22	83	0	5	0	0
Larve non vitali	1	8	34	119	56	126

Inoltre dal pacchetto intestinale, fegato e gonadi è stata fatta una ricerca con metodo di Baermann (Arcangeli G. et al., 2003). Il contenuto della cavità celomatica è stato messo per una notte a bagno all'interno di una reticella sospesa in soluzione fisiologica in un imbuto separatore, a temperatura ambiente ed al buio. Al termine della prova è stato aperto il rubinetto sul fondo dell'imbuto e sono stati raccolti 10 cc in capsula Petri per il controllo della presenza di larve vitali (Tab. 5).

Tab. 5 - Pesce infestato trattato: risultato dell'esame del pacchetto intestinale e gonadi con metodo di Baermann

	100 MPa – 5 min		200 MPa – 5 min		300 MPa – 5 min	
	1° prova	2° prova	1° prova	2° prova	1° prova	2° prova
Larve vitali dopo 12 ore a 20°C	11	24	3	4	0	0

La vitalità delle larve è stata valutata in seguito a stimolo tattile (Adams A.M. et al., 1999), con osservazione allo stereomicroscopio (16 X). Le larve sono state osservate in capsule Petri, in liquido di Eagle, tenute a 20°C ed esaminate dopo 1 e dopo 4 ore. L'identificazione del genere è avvenuta tramite osservazione al microscopio ottico 100 X, secondo le chiavi tassonomiche (Koyama T. et al., 1969; Möller H., Anders K., 1986).

Per questa prova si è operato con acqua refrigerata a 4°C. Durante il trattamento HPP l'acqua che è stata utilizzata all'interno della camera di pressurizzazione ha subito in conseguenza all'aumento di pressione un innalzamento di temperatura di 3°C ogni 100 MPa (a 600 MPa sono 18°C): in questo modo il prodotto è stato trattato intorno ai 22°C.

Dopo il trattamento ad alte pressioni si è provveduto all'esame ispettivo dei visceri e della cavità celomatica con la tecnica della dissezione autoptica (Fig. 22 e 23).



Fig. 22 - Fegato e ovaio di sgombro infestati da larve di *Anisakis* dopo trattamento HPP



Fig. 23 - Esame ispettivo dei visceri e della cavità celomatica dopo trattamento HPP

Il grado di infestazione, verificato dopo esame ispettivo, andava da 0 a 80 larve presenti per ogni singolo pesce.

Al termine dell'esame ispettivo dei visceri e della cavità celomatica si è provveduto a raccogliere pacchetto intestinale e gonadi in soluzione fisiologica, per poi procedere all'esame dopo 24 ore utilizzando il metodo di Baermann.

Tab. 6 - Verifica della vitalità delle larve usate come controllo dopo 24 e 48 ore, mantenendo le larve in piastra Petri, in liquido di Eagle, a 20°C al buio

	Vitalità dopo 24 ore		Vitalità dopo 48 ore	
	1° prova	2° prova	1° prova	2° prova
Larve vitali isolate da pesce fresco, pescato da 2 gg e mantenute in liquido Eagle a 4°C	60/60	60/60	58/60	59/60
Larve vitali isolate da pesce pescato da 7 gg e mantenute in liquido Eagle a 4°C.	9/10	36/41	7/10	31/41

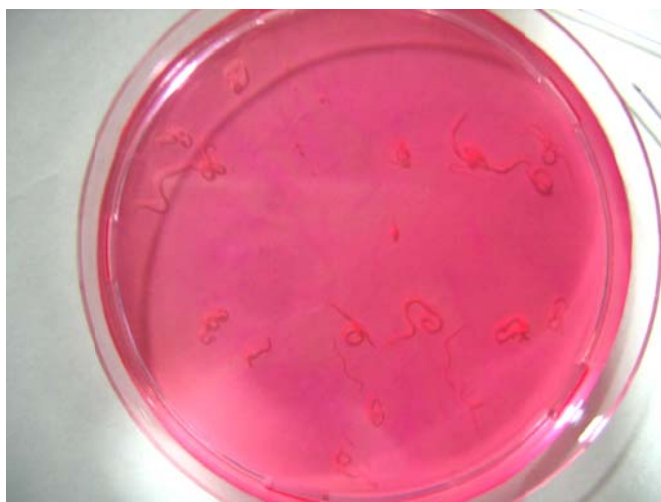


Fig. 24 - Larve di *Anisakis* in piastra Petri, in liquido di Eagle

L'identificazione di specie con PCR è stata eseguita mediante amplificazione della regione comprendente gli spaziatori interni del DNA ribosomale nucleare e successiva digestione con enzimi di restrizione HhaI e HinfI. (Tabella 7).

Tab. 7 - Identificazione delle larve isolate

	<i>Anisakis</i>	Altri generi	Verifica specie (PCR)
Larve 1° prova	20/20 larve esaminate	0	<i>Anisakis simplex sensu stricto</i>
Larve 2° prova	19/20 larve esaminate	1 larva <i>Hysterothylacium</i>	<i>Hysterothylacium aduncum</i>

4.3. Norovirus

I Norovirus sono i più diffusi agenti eziologici di gastroenterite epidemica nel mondo, segnalati in soggetti di tutte le età e tra i primi quali causa di gastroenterite acuta in età pediatrica. Oltre il 50% di tutte le epidemie riportate globalmente come tossinfezioni alimentari sono dovute a Norovirus i quali stanno emergendo come il secondo agente causale di gastroenterite acuta pediatrica tra i soggetti ospedalizzati, dopo i Rotavirus. Nonostante l'assenza di dati epidemiologici nazionali sulle gastroenteriti acute in Italia, i Norovirus sono stati descritti come importante causa di epidemie e di casi sporadici di malattia in un numero crescente di pubblicazioni riguardanti anche l'Italia. La trasmissione dei Norovirus è fecale-orale, per passaggio diretto interumano, tramite alimenti (frutta, verdura, molluschi, acque).

In Europa, tra gli alimenti più oggetto di allerta (sistema RASFF) in quanto responsabili di infezione da Norovirus sono i molluschi bivalvi ed i frutti di bosco. La mancanza a livello nazionale di un sistema organico di sorveglianza delle patologie acute del tratto gastro-enterico, soprattutto a livello pediatrico, non permette una conoscenza completa dell'eziologia italiana circolante sul territorio e l'effettiva prevalenza di infezioni da Norovirus derivante da alimenti.

4.4. Trattamento HPP di vongole veraci

La ricerca è stata condotta sulla ghiandola digestiva dei molluschi bivalvi indicata come organo d'elezione per la concentrazione del Norovirus nei molluschi (Le Guyader F.S. et al., 2008). Il ceppo di Norovirus murino-1 (MNV-1) è stato gentilmente fornito dal Prof. H. W. Virgin, della Washington University School of Medicine, MO, USA. Le linee cellulari: RAW 264.7. Il numero di unità formanti placca (PFU)/ml, è stato determinato con il metodo proposto da Wobus C.E. et al. nel 2004. Sono state contaminate 200 vongole veraci messe in una vasca con 100 litri di acqua con salinità del 3,5% a 15°C e con il 90% di ossigeno disciolto. Le vongole non sono state depurate per ridurre al minimo lo stress di adattamento all'ambiente

artificiale e non comprometterne le capacità filtratorie. Dopo 24 ore di acclimatamento l'acqua della vasca è stata contaminata con MNV-1 in modo da ottenere un titolo finale in acqua pari a 4 log TCID₅₀ ml⁻¹. Le vongole, del peso medio di 10 g ciascuna, sono state lasciate 24 ore in acqua contaminata.

Sono state preparate 7 buste di materiale plastico contenenti 10 vongole veraci contaminate ognuna.

6 buste sono state sottoposte a trattamento con HPP ed il campione rimanente è stato utilizzato come controllo. I singoli sacchetti sono stati conservati a 4°C fino al momento del trattamento con l'alta pressione. La prova è stata ripetuta 3 volte a intervalli di 8 giorni.

I risultati ottenuti sono riportati nelle Tab. 8, 9, 10.

Tab. 8 - Prima prova trattamento HPP Norovirus murino

Condizioni sperimentali		Prova I	Prova II	Prova III	Valore medio
Pressione (MPa)	Tempo di applicazione (min.)	Titolo virale			
Non trattato	-	9.4x10 ⁴	3.75x10 ⁴	2.73x10 ⁴	5.29x10 ⁴
300	1	8.3x10 ⁴	1.5x10 ⁴	1.3x10 ⁴	3.7x10 ⁴
300	3	1.95x10 ⁴	1.9x10 ⁴	0.8x10 ⁴	1.55x10 ⁴
300	5	2.25x10 ⁴	5.2x10 ⁴	1.6x10 ⁴	3.01x10 ⁴
400	1	1.0x10 ⁴	0.43x10 ⁴	0.2x10 ⁴	0.54x10 ⁴
400	3	1.2x10 ²	3.5x10 ²	1.4x10 ²	2.03x10 ²
400	5	1.3x10 ²	0.65x10 ²	0.1x10 ²	0.68x10 ²
500	1	Neg	Neg	Neg	Neg
500	5	Neg	Neg	Neg	Neg
Controllo negativo		Neg	Neg	Neg	Neg

Tab. 9 - Seconda prova trattamento HPP Norovirus murino

Condizioni sperimentali		Prova I	Prova II	Prova III	Valore medio
Pressione (MPa)	Tempo di applicazione (min.)	Titolo virale			
Non trattato	-	2.6×10^3	1.6×10^3	-	2.1×10^3
300	5	2.5×10^3	2.5×10^3	1.6×10^3	2.2×10^3
400	5	1×10^1	1×10^1	2×10^1	1.3×10^1
500	1	Neg	Neg	Neg	Neg
500	5	Neg	Neg	Neg	Neg
Controllo negativo		Neg	Neg	Neg	Neg

Tab. 10 - Terza prova trattamento HPP Norovirus murino

Condizioni sperimentali		Prova I	Prova II	Prova III	Valore medio
Pressione (MPa)	Tempo di applicazione (min.)	Titolo virale			
Non trattato	-	4.2×10^4	-	-	4.2×10^4
300	5	1.2×10^4	1.8×10^4	-	1.5×10^4
400	5	0.8×10^4	1.2×10^4	-	10^4
400	10	3.6×10^3	3.5×10^3	-	3.55×10^3
500	1	Neg	Neg	Neg	Neg
500	5	Neg	Neg	Neg	Neg
Controllo negativo		Neg	Neg	Neg	Neg

Le concentrazioni virali di MNV-1 ottenute nelle vongole nella seconda prova sono diverse dalle altre due prove. Nella prima prova la media iniziale è stata pari a 3.7×10^4 e nella terza prova 1.5×10^4 mentre nella seconda è stata di un logaritmo inferiore. Nonostante le identiche condizioni chimico-fisiche dell'acqua durante la fase di contaminazione, il fatto di avere analizzato due campioni a differenza di un mese può aver influito sulla capacità filtratoria degli stessi. Questo fatto non ha comunque compromesso i risultati che dimostrano un trattamento efficace per la devitalizzazione del MNV-1 con valori pari a 500 MPa x 1' in entrambe le prove. E' evidente anche un gradiente di efficacia riferito al valore di pressione applicato pari ad un calo di circa due logaritmi ogni 100 MPa.

5. CONCLUSIONI

5.1. Trattamento HPP di sgombri infestati da *Anisakis*

Come si può evincere dalla Tabella riassuntiva 11, il trattamento iperbarico applicato per 5 minuti ad una pressione pari a 300 MPa è risultato efficace al fine di devitalizzare tutte le larve presenti nei pesci, sia le larve trattate dopo essere state isolate dai pesci e poste in sacchetto plastico, sia tutte le larve rinvenute nei pesci dopo il trattamento.

Tab. 11 - Risultati complessivi della vitalità delle larve presenti nel pesce infestato trattato dopo esame ispettivo dei visceri, della cavità celomatica ed arricchimento con metodo di Baermann, del pacchetto viscerale e gonadi.

<i>Anisakis</i>	100 MPa – 5 min	200 MPa – 5 min	300 MPa – 5 min
Larve vitali	140	12	0
Larve non vitali	9	153	182

Il controllo di vitalità delle larve prelevate da sgombri non trattati e facenti parte delle medesime due partite, ha confermato che le larve erano vive e vitali risultando ancora attive nella loro motilità dopo prelievo da pesce mantenuto 7 giorni refrigerato e verifica dopo 48 ore in liquido di Eagle.

Il fatto che le larve isolate e trattate in sacchetti a parte siano risultate più sensibili rispetto alle larve contenute nei pesci, in quanto sono bastati 200 MPa per 5 min per la devitalizzazione, può essere dovuto al fatto che hanno subito un maggiore stress in seguito ad una maggior manipolazione ed anche perché in numero inferiore. Come riportato anche da altri autori (Molina Garcia A.D., Sanz P.D., 2002), il tessuto non comporterebbe una protezione rispetto alle larve isolate in quanto il processo HPP è istantaneo e immediato in ogni punto del volume della camera iperbarica e non dipende dallo spessore del materiale sottoposto a trattamento.

L'impiego del metodo di Baermann per la ricerca di larve vitali si è reso necessario in quanto lo sgombro possiede numerose appendici piloriche tra cui possono nascondersi piccole larve altrimenti invisibili al solo esame ispettivo, come confermano i dati ottenuti.

Le prove svolte confermano che il pesce azzurro, in questo caso lo sgombro, se sottoposto al trattamento HPP con opportuna combinazione di tempo e pressione, può essere bonificato riguardo la presenza di larve vitali di nematodi del genere *Anisakis*.

Vengono confermati precedenti lavori eseguiti però con autoclavi di caratteristiche diverse e con diversi intervalli di tempo e temperatura (Molina Garcia A.D., Sanz P.D., 2002; Dong F.M. et al., 2003).

Ai valori di tempo e pressione impiegati, il pesce è apparso di colore leggermente più chiaro e di consistenza lievemente aumentata rispetto al controllo. Del resto è noto che le alte pressioni iniziano a denaturare la miosina a valori tra 100 e 200 MPa e solo a valori inferiori a 140 MPa non si hanno alterazioni nel pesce (Ashie I.H., Simpson B.K., 1996; Chevalier D. et al., 2001).

Il fatto che ai valori applicati gli sgombri non abbiano subito alterazioni organolettiche tali da pregiudicare la commercializzazione, fa ben sperare in un'applicazione su pesce azzurro come sardine e alici, in particolare per un loro impiego per la preparazione di prodotto marinato. Questa pratica comporta un netto scolorimento del prodotto che potrebbe quindi essere commercializzato senza il ricorso a congelamento o a trattamenti di marinatura particolari, con alte percentuali di sale e aceto, necessari per devitalizzare le larve di *Anisakis*.

Le alte pressioni, verosimilmente, non alterando la cuticola esterna del parassita con possibile dispersione di materiale antigenico, non comportano un aumento del potere allergenico (Molina Garcia A.D., Sanz P.D., 2002). Rimane comunque evidente che, anche nel caso di impiego di questo trattamento di bonifica, non è possibile esimere il produttore ittico dal controllo delle partite di pesce fresco che se manifestamente infestato va comunque eliminato dal commercio, come previsto dal regolamento 853/2004 del Pacchetto igiene.

5.2. Trattamento HPP di vongole veraci

In questi ultimi anni gli episodi mondiali di gastroenterite da Norovirus nell'uomo associati a consumo di molluschi bivalvi sono aumentati. Generalmente le infezioni sono associate al consumo di molluschi crudi o poco cotti. Per questo motivo vari sono gli studi volti ad indagare l'efficacia di trattamenti nei confronti di Norovirus spp. Trattamenti di pastorizzazione e alte pressioni sono quelli maggiormente proposti.

Da notare la graduale diminuzione del titolo virale all'aumentare del valore di pressione applicato. Con 500 MPa per 1 minuto è stata ottenuta la completa inattivazione virale. In altri lavori, le alte pressioni sono state applicate con successo nelle ostriche, notoriamente consumate crude, per verificarne l'efficacia nei confronti di Calicivirus felino e murino.

Non ci sono lavori di valutazione di HPP verso le vongole veraci che più di altri molluschi possono veicolare virus enterici perché vivono in lagune, ambienti con acqua salmastra e chiusi, solitamente contaminati da questi virus e che parimenti ad altri molluschi possono essere consumati crudi o poco cotti (Suffredini E. et al., 2008). Paragonando l'intensità di pressione con la durata dell'applicazione, i due profili mostrano che non esiste correlazione lineare nel decremento di vitalità del virus murino sia all'aumentare del tempo sia dell'intensità di pressione. Il valore di 500 MPa per 1 minuto trovato come efficace, è leggermente superiore a quello impiegato da Kingsley D.H. et al. nel 2007, in ostriche infettate con MNV-1, dove un trattamento con 400 MPa per 5 minuti a 5°C si è dimostrato efficace, impiegando però tempi maggiori e un impianto HPP diverso.

Bibliografia

Adams A. M., Miller K.S., Wekell M.M. and Dong F.M. (1999) "Survival of *Anisakis simplex* in microwave-processed artooth flounder (*Artheresthes stomias*)", J. Food Prot., 62, 403-409

Almudena H., Cano M.P. (1998) "High-Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Tomato Puree", J. Agr. and Food Chem., 46, 266-270

Ananta E., Heinz V., Schluter O., Knorr D. (2001) "Kinetic studies on high-pressure inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores suspended in food matrices" Innovative Food Sci. Emerging Technol., 2, 261-272

Anese M., Nicoli C., Dall'aglio G.F., Lericci C.R. (1994) "Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities", J. Food Biochem., 18, 285-293.

Arcangeli G., Baldrati G., Pirazzoli P. (2003) "La trasformazione dei prodotti della pesca: tecnologia, controllo e igiene di lavorazione", Ed. Stazione Sperimentale Industria delle Conserve Alimentari Parma.

Armentia A., Lombardero M., Callejo A., Martin Santos J.M., Gil F.J., Vega J., Arranz M.L., Martinez C. (1998) "Occupational asthma by *Anisakis simplex*", J. Allergy Clin. Immunol., 102(5), 831-834.

Ashie I.H., Simpson B.K. (1996) "Application of high hydrostatic pressure to control enzyme related fresh seafood texture deterioration", Food research Int., 29, 569-575.

Audicana L., Audicana M.T., Fernandez de Corres L., Kennedy M.W. (1997) "Cooking and freezing may not protect against allergenic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in humans", *Vet. Rec.*, 140(9), 235.

Audicana M.T. et al. (2002) "Anisakis simplex: dangerous dead or alive?", *Trends in parasitol.*, 18, 20-25.

Baert L., Uyttendaele M., Vermeersch M., Van Coillie E., Debevere J. (2008) "Survival and transfer of murine norovirus a surrogate for human noroviruses, during the production process of deep-frozen onions and spinach.", *J. Food Prot.*, 71, 87-94.

Balny, Masson (1989) "Les hautes pressions: outil d'investigation biochimique", *Innov. Tech. Biol. Med.*, 9, 294-320.

Bernardini R., Novembre E., Vierucci A. (1998) "Anisakis visto dall'allergologo" *Not. Allergol.*, 17, 42.

Bridgman (1914) "The coagulation of albumen by pressure", *J. Biol. Chem.*, 19(1), 511-512.

Caramello P., Vitali A., Canta F., Caldana A., Santi F., Caputo A., Lipani F., Balbiano R. (2003) "Intestinal localization of anisakiasis manifested as acute abdomen", *Clin. Microbiol. Infect.*, 9(7), 734-737.

Cano M.P., Hernandez A., De Ancos B. (1997) "High Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Strawberry and Orange Products", *Journal of Food Science*, 62, 85-88.

Carpi G., Gola S., Bazzarini R., Barbieri G., Maggi A., Rovere P. (1996) "Fragole in pezzi trattate alle alte pressioni", *Industria Conserve*, 71, 177-183.

Castellari M., Matricardi L., Arfelli G., Rovere P., Amati A. (1997) "Effects of high pressure processing on polyphenoloxidase enzyme activity of grape musts", *Food Chemistry*, 60(4), 647-649.

Cheftel (1992) "High Pressure and Biotechnology", vol.224, 195-209.

Chevalier D., Le Bail A., Ghoul M. (2001) "Effects of high pressure treatment (100-200 MPa) at low temperature on turbot (*Scophthalmus maximus*) muscle", *Food Res. Int.*, 34, 425-429.

Cocchi (1990) "Elementi di termofisica generale e applicata", Ed. Esculapio s.r.l. Bologna, 197.

Defaye A.B., Ledward D.A. (1995) "Pressure-induced dimerisation of met-myoglobin", *J. Food Sci.*, 60, 262-265.

Dominguez Ortega J., Cimarra M., Sevilla M., Alonso Llamazares A., Moneo I., Robledo Echarren T., Martinez-Cocera C. (2000) "Anisakis simplex: a cause of intestinal pseudo-obstruction" *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 92(3), 132-139.

Dong F.M., Cook A.R., Herwig R.P. (2003) "High Hydrostatic Pressure Treatment of Finfish to Inactivate *Anisakis simplex*", *J. Food Prot.*, 66, 1924-1926.

Dziekonska Rynko J., Rokicki J., Jablonowski Z. (2002) "Effects of Ivermectine and Albendazole against *Anisakis simplex* in vitro and Guinea Pigs", *J. Parasitology*, 88(2), 395-398.

Esteve C., Resano A., Diaz-Tejeiro P., Fernandez-Benitez M. (2000) "Eosinophilic gastritis due to *Anisakis*: a case report", *Allergol. Immunopathol*, 28(1), 21-23.

Fioravanti M.L., Zamperetti S., Minelli C., Restani R. e Sigovini G. (1996) "Distribution of Anisakidae larvae in marine fish from the Northern Adriatic Sea", Abs. VII European multicolloquim of Parasitology, Parma, 34-39.

Fioravanti M.L., Gavaudan S., Tonucci F., Bagnini (2003) "Indagine sulla diffusione di larve di *Anisakis* e *Hysterothylacium* in pesci del Mar Adriatico centrale", Atti LVII Convegno Nazionale Società Italiana Scienze Veterinarie, Ischia - Napoli, 25 - 27 settembre.

Giuffrida A., Ziino G., Pennisi L. (2002) "Larve *Anisakis* in *Sepia officinalis* del Mediterraneo", Ind. Alim., 41, 1086-1088.

Gola S., Palmieri L., Cacace D., Dall'Aglio G.F. (1992) "Stabilità microbiologica di prodotti acidi trattati con alte pressioni", Industria Conserve, 67, 417-420.

Gomez B., Tabar A.I., Tunon T., Larrinaga B., Alvarez M.J., Garcia B.E., Olaguibel J.M. (1998) "Eosinophilic gastroenteritis and *Anisakis*", Allergy, 53(12), 1148-1154.

Gonzalez L. (1998) "Infección experimental de ratones con larvas de *Hysterothylacium aduncum* obtenidas de cultivos marinos de truchas en Chile", Arch. med. vet., 30(1), 139-142.

Gow-Chin Y., Hsin-Tang L. (1996) "Effects of High Pressure and Heat Treatment on Pectic Substances and Related Characteristics in Guava Juice", Intern. J. of Food Science and Technol., 31, 205-213.

Hara G. (1990) "Effect of high pressure on inactivation of enzymes and microorganism in non pasteurized rice wine", Nippon Nogeikagaku Kalhi, 64, 1025-1029.

Hauck A.K. (1977) "Occurrence and survival of the larval nematode *Anisakis* sp. in the flesh of fresh, frozen, brined and smoked pacific herring, *Clupea harengus pallasi*." *J.Parasitol.*, 63(3), 515-519.

Hayashi R. (1996) "An overview of the use of high pressure in bioscience and biotechnology", *Progress in Biotechnology*, 13, 1-6.

Hedén C.G. (1964) "Effects of hydrostatic pressure on microbial systems", *Bacteriological Reviews*, 28(1), 14-29.

Heremans L. (1982) "High pressure effect on proteins and other biomolecules", *Ann. Rev. Biophys. Bioengng.*, 11, 1-21.

Hite (1899) "The effect of pressure in the preservation of milk", *West Va. Agr. Exp. Stat. Bull.*, 58, 15-35.

Hoover D.G., Metrick C., Papineau A.M. et al. (1989) "Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms", *Food Technol.*, 43(3), 99-107.

Johnson F.H., Campbell D.H (1945) "The retardation of protein denaturation by hydrostatic pressure", *Journal of Cell Comp Physiol.*, 26, 43-46.

Knorr (1993) "Effects of high-hidrostatic-pressure processes on food safety and quality", *Food Technol.*, 47, 156-161.

Koyama T., Kobayashi A., Kumada M., Komiya Y., Oshima T., Kagei N., Ishii T. e Machida M. (1969) *Jap. J. Parasitol.*, 18, 466-487.

Kunugi (1989) "Activity control and denaturation of enzymes by high pressure, High pressure use in food" Hayashi, San-Ei Pub. Co., 103-119.

Le Guyader F.S., Bon F., DeMedici D., Parnaudeau S., Bertone A., Crudeli S., (2006) "Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption.", *J. Clin. Microbiol.*, 44 (11), 3878-82.

Le Guyader F.S., Loisy F., Atmar R.L., Hutson A.M., Estes M.K., Ruvoën-Clouet N., Pommepuy M., Le Pendu J. (2006) "Norwalk Virus-specific Binding to Oyster Digestive Tissues", *Emerg Infect Dis.*, 12(6), 931-936.

Le Guyader F.S., Le Saux J.C., Ambert-Balay K., Krol J., Serais O., Parnaudeau S. (2008) "Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak", *J. Clin. Microbiol.*, 46(12), 4011-4017.

Lerici C.R., Lercker G. (1983) "Principi di Tecnologie Alimentari" Ed. Clueb Bologna.

Lopez Serrano M.C., Alonso Gomez A., Daschner A., Moreno Ancillo A., De Parga J.M.S., Caballero M.T., Barranco P., Cabanas R. (2000) "Gastroallergic anisakiasis: Findings in 22 patients", *J. of Gastroenterology and Hepatology*, 15, 503-506.

Macdonald (1992) "Effect of high hydrostatic pressure on naturale and artificial membranes", *High Pressure and Biotechnology*, 67-75.

Maggi P. et al. (2000) "Gastrointestinal infection due to *Anisakis simplex* in sothern Italy", *European J. Epidem.*, 16, 75-78.

Manfredi M.T., Genchi C. (1998) "Anisakis visto dal parassitologo" *Not. Allergol.*, 17,37.

Matser A.M., Knott E.R., Teunissen P.G.M., Bartels P.V. (2000) "Effects of high isostatic pressure on mushrooms", J. of Food Engineering, 45, 11-16.

Molina Garcia A.D., Sanz P.D. (2002) "Anisakis simplex Larva Killed by High-Hydrostatic-Pressure Processing", J. Food. Prot., 65, 383-388.

Möller H., Anders K. (1986) "Diseases and parasites of marine fishes", Verlag Möller.

Moneo I., Caballero M.L., Gomez F., Ortega E. e Alonso M.J. (2000) "Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*", J. Allergy Clin. Immunol., 106, 177-182.

Moreno Ancillo A., Caballero M.T., Cabanas R., Contreras J., Martin Barroso (1997) "Allergic reactions to anisakis simples parasitizing seafood", Ann. Allergy Asthma Immunol., 79(3), 246-250.

Morild (1981) "The theory of pressure effects on enzymes", Adv. Protein Chem., 34, 93.

Orecchia P., Paggi L., Mattiucci S., Di Cave D., Catalini N. (1989) "Infestazione da larve di *Anisakis simplex* A e *Anisakis physeteris* in specie ittiche dei mari italiani", Parassitologia, 31, 37-43.

Overstreet, R.N., Meyer G.W. (1981) "Hemorrhagic lesions in stomach of Rhesus monkey caused by a piscine ascaridoid nematode", J. Parasitol., 67, 226-235.

Pampiglione S. et al. (2002), "Human anisakiasis in Italy : a report of eleven new cases", Pathol. Res. Pract., 198, 429-434.

Panebianco A., Lo Schiavo A. (1985), "Ricerca di larve di Anisakidi in aringhe salate e affumicate del commercio. Considerazioni di carattere ispettivo", *La Clinica Vet.*, 108, 180-184.

Perteguer M.J., Chivato T., Montoro A., Cuellar C., Mateos J.M., Laguna R. (2000) "Specific and total IgE in patients with recurrent, acute urticaria caused by *Anisakis simplex*", *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 94(3), 259-268.

Prèstamo G., Arabas J., Fonberg-Broczek M., Arroyo G. (2001) "Reaction of *B. cereus* Bacteria and Peroxidase Enzymes under Pressures >400 MPa", *J. Agricult. and Food Chem.*, 49, 2830-2834.

Purello D'Ambrosio F., Pastorello E., Gangemi S., Lombardo G., Ricciardi L., Fogliani O., Merendino R.A. (2000) "Incidence of sensitivity to *Anisakis simplex* in a risk population of fishermen/fishmongers", *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 84(4), 439-444.

Quaglia (1993) "L'alta pressione nelle tecnologie alimentari", *Industrie Alimentari*, 22, 1082-1085.

Raghubeer E., Ting E., Balasubramaniam V.M. (2000) "Determining thermal effects in high-pressure processing", *Food Technology*, 56, 31-35.

Reddy N.R., Solomon H.M., Fingerhurt G.A, Rhodehamel E.J., Balasubramaniam V.M., Palaniappan S. (1999) "Inactivation of *Clostridium botulinum* type e spores by high pressure processing", *J. Food Safety*, 19, 277-278.

Regolamento (CE) n. 853-854/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 (G.U.C.E. 30 aprile 2004 n. L 139).

Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali.

Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 Novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.

Regolamento (CE) n. 2074/2005 della Commissione del 5 Dicembre 2005 recante modalità di attuazione relative a taluni prodotti di cui al regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio.

Renon P., Malandra R. (1991) "Anisakidosi. Indagine sulla presenza di larve di anisakidi in teleostei marini catturati nei mari italiani", *Obiettivi e Doc. Veterinari*, 12(10), 73-79.

Rodriguez J., Reano M., Vives R., Canto G., Daroca P., Crespo J.F., Vila C. (1997) "Occupational asthma caused by fish inhalation", *Allergy*, 52(8), 866-869.

Romeo Ramirez J.A., Martinez Conde Lopez A.E. (1997) "Gastric anisakiasis diagnosed by endoscopy", *Gastroenterol. Hepatol.*, 20(6), 306-308.

Rovere P., Carpi G., Maggi A. (1994) atti del "Steenbock Symposium on high Pressure Effects in Molecular Biophysics and Enzymology", University of Wisconsin-Madison, Wisconsin USA.

Rovere P., Sandei L., Colombi A., Munari M., Giretti G., Carpi G., Dall'Aglio G.F. (1997) "Effetti del trattamento ad alta pressione su triturato di pomodoro", *Industria Conserve*, 72, 3-12.

Silvia J.L., Weber G. (1993) "Pressure stability of proteins", *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 44, 89-113.

Suffredini E., Corrain C., Arcangeli G., Fasolato L., Manfrin A., Rossetti E., Biazzi E., Mioni R., Pavoni E., Losio M., Sanavio G., Croci G. (2008) "Occurrence of Enteric Viruses in shellfish and relation to climatic-environmental factors", *Letters in Appl. Microbiol.*, 20, 462-468.

Tewari G, Jayas D S, Holley R A. (1999) "High pressure processing of foods: an overview", *Sciences des Aliments*, 19(6), 619-661.

Timson W.J., Short A.J. (1965) "Resistance of microorganisms to hydrostatic pressure", *Biotechnol. Bioeng.*, 7, 139-159.

Van den Broek I., Ludikhuizen L.R., Weemaes C.A., Van Loey A.M., Hendrickx M.E. (1999) "Thermal inactivation kinetics of Pectinesterase extracted from oranges", *Journal of Food Processing Preservation*, 23, 391-406.

Van Thiel P.H., Kuipers F.C. and Roskam R.T.H. (1960) "A nematode parasitic to herring, causing acute abdominal syndromes in man", *Trop. Geogr. Med.*, 12, 97-113.

Weber, Drickamer (1983) "The effects of high pressure upon proteins and other biomolecules", *Quarterly Reviews of biophysics*, 16, 89-112.

Wobus C.E., Karst S.M., Thackray L.B., Chang K.O., Sosnovtsev S.V., Belliot G., et al. (2004) "Replication of norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages" *PLoS Biology*, 2, 2076–2084.

Wobus, C.E., Thackray, L.B., Virgin, H.W. (2006) “Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis”, *Journal of Virology*, 80, 5104–5112.

Zimmerman, Bergman (1993) “Isostatic high pressure equipment for food preservation”, *Food Technology*, 47(6), 162-163.

Zobell C.E., Oppenheimer C.H. (1950) “Some effects of hydrostatic pressure on the multiplication and morphology of marine bacteria”, *Journal of Bacteriology*.

Zobell C.E. (1970) “Pressure effects on morphology and life processes of bacteria” in: Zimmerman A.M. “High Pressure Effects on Cellular Processes”, Academic Press Inc., New York, p 85-130.