



Coordinamento a cura del

DIRETTORE DEL DIPARTIMENTO ALIMENTI
RESPONSABILE DEL C.Re.N.A
Centro di Referenza Nazionale Anisakiasi

Dott. Vincenzo Ferrantelli



Premessa



Il C.Re.N.A. è il Centro di Referenza Nazionale per le Anisakiasi. Istituito con Decreto Ministeriale 27 Agosto 2004 ha sede presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri".

I **Centri di Referenza Nazionale** (CdRN), in base all'art. 2 del D.M. 4 ottobre 1999, rappresentano uno strumento operativo di elevata e provata competenza, nei settori della sanità animale, dell'igiene degli alimenti e dell'igiene zootecnica, con finalità specifiche volte a:

- ◆ Confermare, ove previsto, la diagnosi effettuata da altri laboratori;
- ◆ Attuare la standardizzazione delle metodiche di analisi;
- ◆ Avviare idonei "ring test" tra gli IZZSS;
- ◆ Utilizzare e diffondere i metodi ufficiali di analisi;
- ◆ Predisporre piani d'intervento;
- ◆ Collaborare con altri centri di referenza comunitari o di paesi terzi;
- ◆ Fornire al Ministero della Salute, assistenza e informazioni specialistiche.

Le attività del Centro di referenza C.Re.N.A si articolano su tre principali aree tematiche:

- ◆ Sanità pubblica veterinaria,
- ◆ Sicurezza alimentare e patologie allergiche,
- ◆ Epidemiologia dell'Anisakiasi.



Tutte le attività svolte dal C.Re.N.A sono indirizzate alla tutela e alla promozione della salute della popolazione attraverso lo sviluppo di conoscenze, strumenti e strategie mirate alla sicurezza e qualità dei prodotti ittici, alla lotta contro le zoonosi e alla prevenzione delle patologie associate al consumo di pesce o prodotti a base di pesce non correttamente cotti o trattati. Tra le iniziative di formazione ed informazione specialistica del C.Re.N.A., viene promossa la pubblicazione del presente volume, con l'obiettivo di facilitare lo scambio di esperienze con altri IZZSS presenti nel territorio italiano e con gli Enti di Ricerca operanti nel settore della sanità pubblica. Le tematiche qui affrontate rappresentano un piccolo esempio della varietà di ambiti di ricerca ed intervento che costituiscono lo spazio di competenza del C.Re.N.A.

Con la diffusione di questo opuscolo ci si prefigge, inoltre, lo scopo di "educare" il consumatore alla prevenzione ed "orientarne" i comportamenti verso una corretta e sana alimentazione.



Il Direttore Generale
Dott. Antonino Salina





Indice

- ◆ **PREMESSA**
- ◆ **INTRODUZIONE**
- ◆ **EZIOLOGIA**
 - CLASSIFICAZIONE
 - MORFOLOGIA
 - CICLO BIOLOGICO
 - SPECIE ITTICHE MAGGIORMENTE COINVOLTE
- ◆ **LA MALATTIA NELL'UOMO**
 - PATOGENESI
 - RISPOSTA IMMUNOLOGICA
 - DIAGNOSI
- ◆ **DIAGNOSTICA BIOMOLECOLARE**
 - PCR RFLP
 - PCR REAL-TIME
- ◆ **PREVENZIONE**
- ◆ **NORMATIVA DI RIFERIMENTO**
- ◆ **ILLUSTRAZIONE PROCESSO DI LAVORAZIONE**
- ◆ **CONCLUSIONI**



Ringraziamenti

Ho sempre creduto che occuparsi di Sanità Pubblica voglia dire tutelare le persone. È proprio partendo da tale considerazione che iniziative culturali come questa, trovano il pieno consenso della Direzione Sanitaria dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia.

Il nostro Ente ha il piacere e la responsabilità di annoverare tra i suoi laboratori specialistici, quello d'eccellenza del Laboratorio di Referenza Nazionale per l'Anisakiasi. Il Centro opera quotidianamente nel settore della prevenzione della malattia, includendo, oltre alla diagnosi, la sorveglianza sul territorio, la ricerca e la sperimentazione. Nell'ambito delle proprie finalità istituzionali legate anche alla formazione, alla comunicazione e alla divulgazione dei contenuti propri delle attività sperimentali dell'Ente, sicuramente questo lavoro fornisce un valido supporto a tutti gli operatori del settore ma anche a quanti vogliono approfondire le proprie conoscenze su una patologia con cui il cittadino consumatore di alimenti a rischio, si trova a dover convivere.

E' con vivo piacere quindi che ringrazio quanti hanno collaborato alla stesura di questo opuscolo e auspico che i Ricercatori di questo Istituto operino sempre al massimo delle conoscenze scientifiche e promuovano la condivisione del patrimonio di conoscenze, la valorizzazione, la diffusione ed il trasferimento dei risultati delle attività dell'Istituto.



Il Direttore Sanitario
Dott.ssa Rossella Colomba Lelli



Introduzione

L'Anisakiasi è una malattia parassitaria causata da nematodi del genere *Anisakis*, contratta dall'uomo a seguito dell'assunzione di prodotti della pesca infestati, consumati crudi, poco cotti o sottoposti a processi di conservazione non in grado di devitalizzarne le larve. Tale zoonosi, inizialmente riscontrata nei paesi del Sud-Est Asiatico come conseguenza delle abitudini alimentari di consumare pesce crudo o impropriamente trattato, oggi si è diffusa in tutto il mondo.

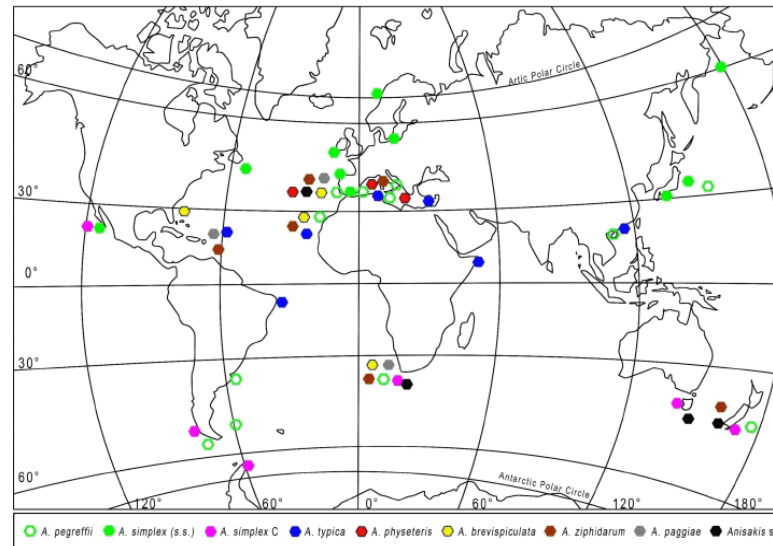


Figura 1. Distribuzione geografica di *Anisakis spp.* geneticamente individuata (Mattiucci et al. 2006)



La prima segnalazione dell'infestazione di *Anisakis* nell'uomo risale al 1876 ad opera dello zoologo tedesco Rudolf Leuckart. Nel 1958 Ishikura e Asanuma in Giappone descrissero il primo caso di localizzazione intestinale dovuta all'assunzione di pesce crudo. In Italia il primo caso è stato riportato a Bari nel 1996 (Stallone et al., 1996).

Ad oggi i casi diagnosticati in tutto il mondo sono oltre 20.000 con un incremento stimato di circa 2.000 casi l'anno (De Rosa 2011).

Il 90% delle segnalazioni provengono dal Giappone, Paese in cui le radicate tradizioni alimentari portano al frequente consumo di prodotti ittici crudi preparati in forma di "sashimi" (fig.2 A) o "sushi" (fig.2 B) (Suginachi et al. 1985).



Figura 2. A Sashimi

B. Sushi (Nigiri)



In Italia l'incremento delle segnalazioni di Anisakiasi (Pampiglione et al. 2002) è dovuto prevalentemente al consumo di pesce crudo o sottoposto a processi di trattamento quali salagione, marinatura e affumicatura (Figura 3 e 4). La casistica, nel nostro Paese, appare notevolmente sottostimata, come parzialmente confermato dalla descrizione di numerosissimi casi di "probabile" Anisakiasi, la cui diagnosi si basa unicamente su prove sierologiche, senza l'isolamento diretto del parassita. L'aumento di importazioni di prodotti ittici da Paesi terzi con elevata endemia ha contribuito ulteriormente alla diffusione della patologia nell'uomo. L'attualità della problematica relativa alla presenza di parassiti nei prodotti ittici, con particolare riferimento ai nematodi appartenenti al genere *Anisakis*, ha indotto la Commissione Europea a richiedere agli esperti sui pericoli biologici dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), un parere scientifico pubblicato nel 2010 sull'*EFSA journal*: "*Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products*". In questo contesto europeo è stata sottolineata la necessità di raccogliere nuovi dati sulle parassitosi, compito privilegiato attuale del C.Re.N.A.



Figura 3: Aringhe affumicate





Figura 4: A Alici marinate B Sarde salate



Eziologia

L'esatta collocazione tassonomica dei parassiti è essenziale poiché non tutti i nematodi appartenenti alla Famiglia Anisakidae sono di interesse per la salute umana. I principali responsabili dell'Anisakiasi sono i parassiti appartenenti al genere *Anisakis*. Un ruolo simile è attribuito al genere *Pseudoterranova* mentre non sono stati segnalati casi associati ai generi *Contracoecum* ed *Hysterothylacium*.

Classificazione

La classificazione dei parassiti appartenenti alla famiglia Anisakidae è stata sottoposta a diverse revisioni dando origine a diverse nomenclature. Tuttavia quella a cui gli studiosi fanno maggiormente riferimento è la seguente:

- ◆ Phylum NEMATODA
- ◆ Classe SECERNENTEA
- ◆ Ordine ASCARIDIDA
- ◆ Superfamiglia ASCARIDOIDEA
- ◆ Famiglia ANISAKIDAE
 - Genere *Anisakis*
 - Genere *Pseudoterranova*
 - Genere *Contracoecum*
 - Genere *Hysterothylacium*



Genere *Anisakis* (Dujardin 1845)

Le forme larvali dei nematodi appartenenti al genere *Anisakis* sono visibili ad occhio nudo nei prodotti ittici ed hanno una lunghezza che varia tra 1 e 3 cm. La loro colorazione può variare dal bianco al giallastro, sono sottili e tendono a presentarsi arrotolati su se stessi.

Caratteri Morfologici

Lo studio dei caratteri morfologici al microscopio ottico consente di differenziare le larve appartenenti al genere *Anisakis* in due morfotipi (I e II), in base alle caratteristiche morfologiche dell'estremità cefalica, dell'aspetto del ventricolo (cilindrico nel tipo I e sferico nel tipo II) e dell'estremità caudale (presenza del mucrone solo nel morfotipo I). Si differenziano dagli altri generi per l'assenza dell'appendice esofagea e del cieco intestinale. Il poro escretore è situato alla base dell'estremità anteriore. La suddivisione in morfotipi è stata confermata dalle analisi biomolecolari.

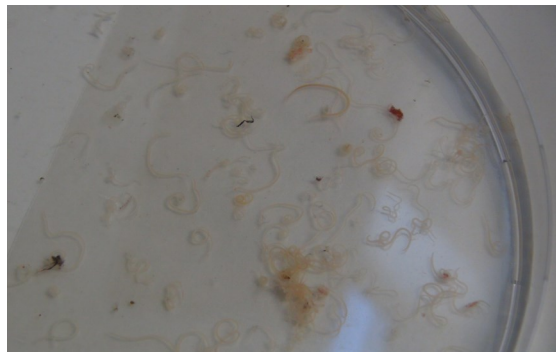


Figura 5: Piastra con larve di *Anisakis* prelevate da campione di pesce.





Figura 6: Estremità cefalica con dente terebrante



Figura 7: Ventricolo cilindrico

**Anisakis Tipo I
(Sensu Berland, 1961)**

- ◆ *A. simplex* s.s.
- ◆ *A. pegreffii*
- ◆ *A. simplex* C
- ◆ *A. ziphidarum*
- ◆ *A. typica*



Figura 8: Estremità caudale con mucrone.





Figura 9: Estremità cefalica con dente terebrante. **Figura 10:** Ventricolo sferico.

Anisakis Tipo II
(*Sensu Berland, 1961*)

- ◆ *A. physeteris*
- ◆ *A. brevispiculata*
- ◆ *A. paggiae*

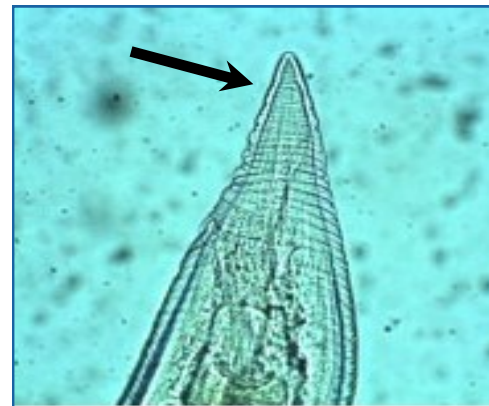
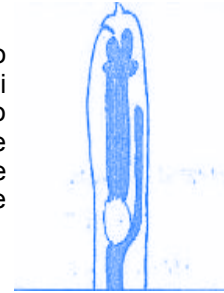


Figura 11: Terminazione caudale conica.



Genere *Pseudoterranova*

Le larve sono facilmente visibili grazie alla loro colorazione rosso-bruna ed alle loro dimensioni (lunghezza compresa fra i 2,5 ed i 4 cm con un diametro di 2 mm). Normalmente si osservano arrotolate su se stesse, come quelle di *Anisakis* ma con la spirale piuttosto larga e meno compatta. Le larve vive presentano movimenti vistosi.



Caratteri Morfologici

Le caratteristiche morfologiche associate al genere *Pseudoterranova* comprendono la presenza del cieco intestinale in prossimità del ventricolo e l'assenza dell'appendice esofagea. Il poro escretore è posizionato similmente al genere *Anisakis*.

Cieco intestinale

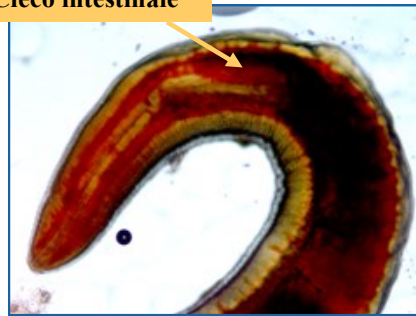


Figura 12: Estremità cefalica e cieco intestinale

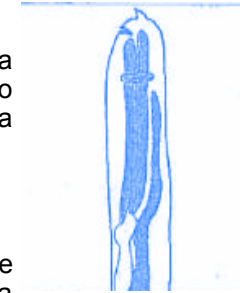


Figura 13: Larve appartenenti al genere *Pseudoterranova* spp.



Genere *Contracoecum*

Le larve di questo genere hanno una forma caratteristica "ad uncino", piuttosto affusolata alle due estremità. Sono di colore bianco-verdastro ed hanno una lunghezza media di 1 cm.



Caratteri Morfologici

I caratteri distintivi del genere *Contracoecum* che emergono alla microscopia ottica comprendono: la presenza del cieco intestinale e dell'appendice esofagea, il poro escretore situato nella parte anteriore e l'assenza di spine o mucroni nell'estremità caudale.

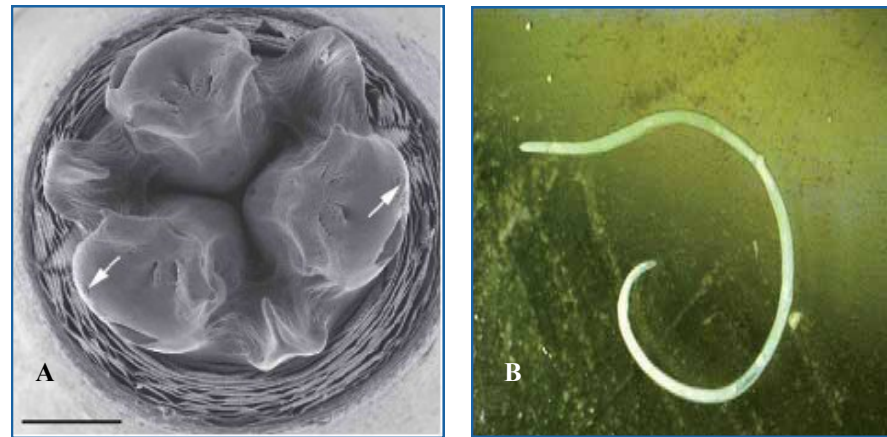
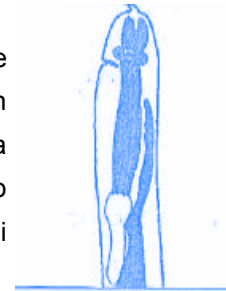


Figura 14: **A** Immagine al SEM di Larva L3 di *Contracoecum*. Le frecce indicano le labbra dell'estremità anteriore. **B** Larva *in vivo*.



Genere *Hysterothylacium*

Il genere *Hysterothylacium* (o *Tynnascaris*) sembra essere meno coinvolto nella patologia umana. Attualmente non sono stati riportati casi in bibliografia, probabilmente per la sua scarsa resistenza al calore. Le larve infatti perdono ogni attività vitale a 30 °C, temperatura ben al di sotto di quella corporea (37 °C).



Caratteri Morfologici

Le larve appartenenti al genere *Hysterothylacium* presentano all'estremità anteriore un piccolo dente appuntito, all'estremità posteriore una piccola spina ed un cieco intestinale. La presenza dell'appendice esofagea ne consente la differenziazione con gli altri generi.

Le larve, generalmente non arrotolate, sono biancastre, lunghe circa 0,7-1,5 cm, quindi più piccole e sottili di quelle del genere *Anisakis*. Nei pesci si possono trovare forme di sviluppo larvale più avanzato dello stadio L3, differenziandosi da quest'ultimo sia per l'estremità anteriore (presenza di tre labbra ben sviluppate), che per l'estremità posteriore (forma conica con numerose piccole spine che le conferiscono un tipico aspetto a forma di cactus detto "cactus tail").



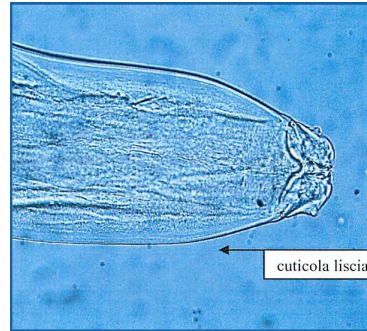


Figura 15: Estremità anteriore *Hysterothylacium*, Stadio L3.



Figura 16: Estremità posteriore *Hysterothylacium*, Stadio L3.

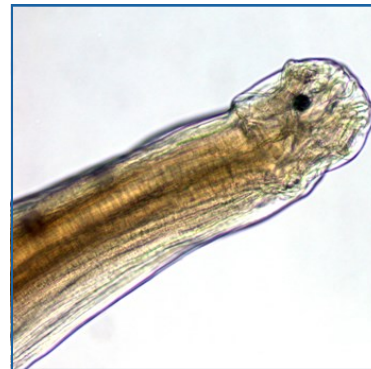


Figura 17: Estremità anteriore forma adulta di *Hysterothylacium*.

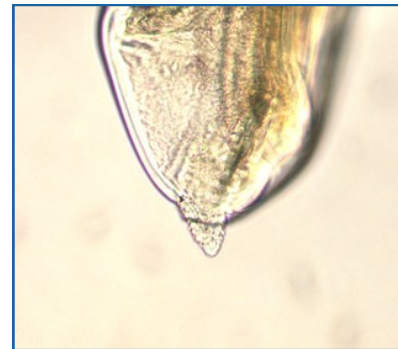


Figura 18: Estremità posteriore forma adulta di *Hysterothylacium* con "cactus tail"



Ciclo Biologico

Il ciclo biologico dei parassiti appartenenti alla famiglia Anisakidae si svolge in ambiente marino attraverso il susseguirsi di quattro stadi larvali (L1 → L4).

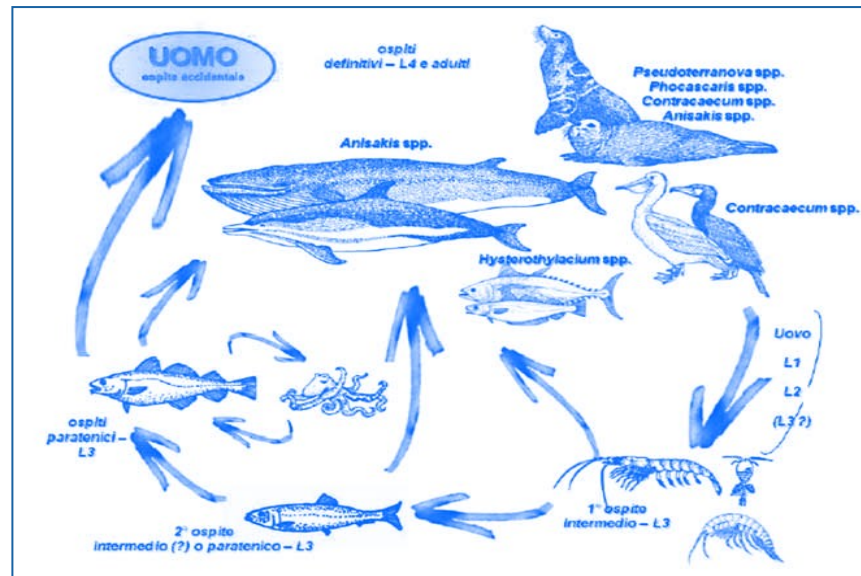


Figura 19: Ciclo biologico della famiglia Anisakidae (AIVEMP 2012).

Le uova prodotte dai parassiti adulti vengono rilasciate in acqua attraverso le feci dei mammiferi marini infestati, qui avviene lo sviluppo in larve L1. Successivamente, una volta libere in acqua, le larve maturano nel secondo stadio (L2).



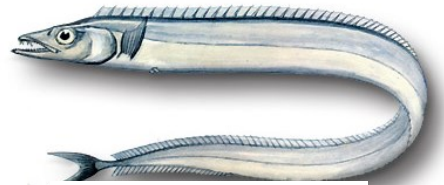
Le larve del genere Anisakidae per sopravvivere devono continuare il ciclo all'interno di ospiti intermedi, prima di raggiungere l'ospite definitivo. I primi ospiti intermedi sono piccoli crostacei come copepodi ed eufasiacei che a loro volta vengono ingeriti da pesci e cefalopodi (Costa *et al* 2012) costituenti i secondi ospiti intermedi. In questi ultimi, le larve allo stadio L2 maturano nel successivo stadio L3, penetrando l'intestino dei pesci nella cavità peritoneale, dove possono raggiungere la lunghezza di 1-4 cm e coinvolgere talvolta gli organi interni e il muscolo. Si arriva infine ai mammiferi marini o agli uccelli marini (per il genere *Contracoecum*), che ingerendo i pesci, consentono il completamento del ciclo biologico del parassita. In questi animali, rappresentanti gli ospiti definitivi, le larve maturano sino al quarto stadio larvale o preadulto (L4) per poi passare alla forma adulta.

E' da sottolineare come le abitudini comportamentali dei mammiferi e degli uccelli marini (principali vettori) di effettuare spostamenti lungo ecosistemi acquatici anche molto distanti, sono alla base della diffusione dei parassiti appartenenti alla famiglia Anisakidae.



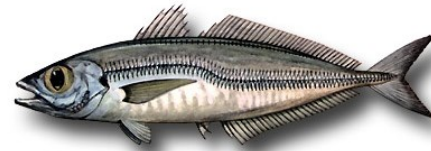
SPECIE ITTICHE MAGGIORMENTE COINVOLTE

Le specie ittiche e i cefalopodi, costituenti la fauna ittica del Mediterraneo, maggiormente parassitati dalle larve del genere *Anisakis*, sono qui elencati in ordine di prevalenza di infestazione (calcolata in percentuale):



Lepidopus caudatus

PESCE SCIABOLA PREV.100%



Trachurus trachurus

SURO PREV.95%



Scomber japonicus

LANZARDO PREV.75%



Scomber scombrus

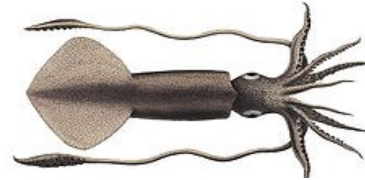
SGOMBRO PREV.71%





Merluccius merluccius

MERLUZZO PREV. 40%



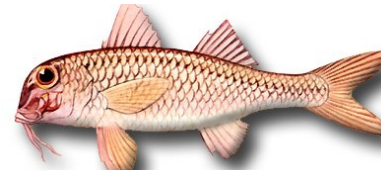
Todarodes sagittatus

TOTANO PREV. 22%



Engraulis encrasicolus

ALICE PREV. 17%



Mullus barbatus

TRIGLIA PREV. 10%



Mugil cephalus

CEFALO PREV. 9%



Sardina pilchardus

SARDINA PREV. 1%



ANISAKIASI - La Malattia nell'Uomo

Malattia, Patogenesi e risposta immunologica

Sebbene il primo caso di Anisakiasi umana sia stato descritto nel 1867 da Leuckart in Groenlandia, la malattia è stata ampiamente studiata negli anni 1950 e 1960 quando in Olanda si verificarono un gran numero di casi nell'uomo, in seguito ad ingestione di aringhe marinate (154 casi accertati tra il 1955 ed il 1968; Van Thiel, 1960-1962). Dei circa 20.000 casi di Anisakiasi sino ad ora riportati (De Rosa 2011), oltre il 90% appartengono al Giappone (dove vengono diagnosticati circa 2.000 casi l'anno). I restanti sono segnalati in Spagna, Olanda e Germania (Sugimachi 1985, Audicana et al., 2002; Bouree et al., 1995).

Negli ultimi 30 anni abbiamo assistito inoltre ad un considerevole aumento dei casi di Anisakiasi in tutto il mondo (Fazii 2011).

Ciò può essere ricondotto a:

- Maggiore uso delle tecniche diagnostiche, in particolare l'endoscopia (in passato molti casi di Anisakiasi gastrica sono stati probabilmente non diagnosticati);
- Aumento globale della richiesta di prodotti ittici;
- Crescente richiesta di cibi crudi o poco cotti, specialmente nei paesi dell'Est, con un incremento del rischio di esposizione ai parassiti.

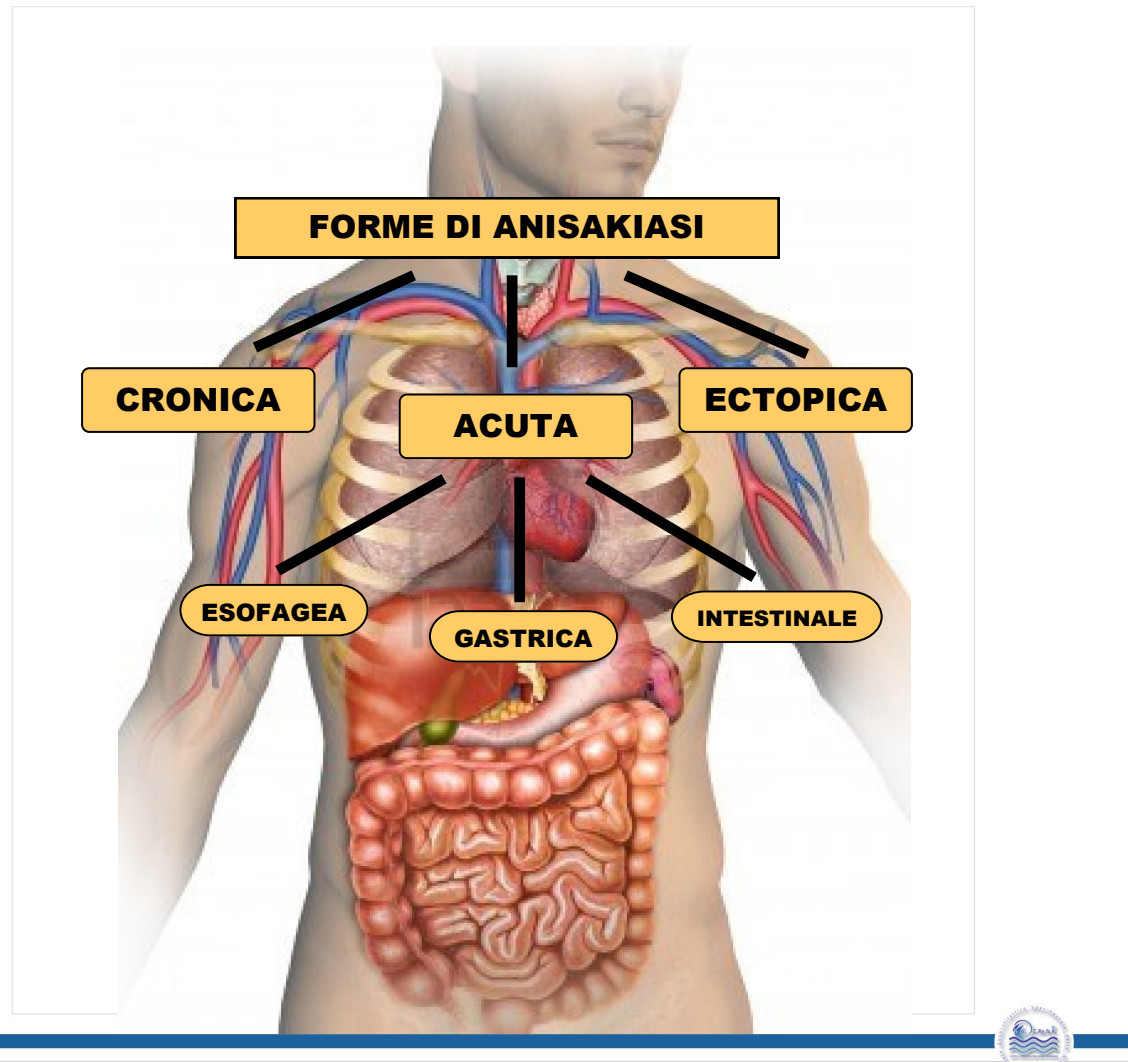


Le larve di questi nematodi sono resistenti ai processi di digestione dell'uomo, penetrano la mucosa gastrica, sia attraverso un'azione meccanica esercitata dalla presenza del dente terebrante, sia mediante il rilascio di enzimi litici (proteasi). Una volta penetrate nella parete gastrica o intestinale le larve inducono fenomeni flogistici. Il ruolo centrale dell'infiammazione viene svolto dai Linfociti T *helper* di tipo 2, che attraverso la produzione di specifiche interleuchine, mediano sia il reclutamento e l'attivazione degli eosinofili, che la differenziazione di linfociti B secernenti immunoglobuline di classe E (IgE) specifiche.



Figura 20: Attecchimento di una larva di Anisakidae alla mucosa gastrica (da www.medicitalia.it)





FORMA ACUTA

Forma esofagea: i casi descritti in letteratura sono molto rari. Questa forma insorge dopo poche ore dal pasto e si presenta con disfagia, bruciore e reflusso gastro-esofageo. La larva ingerita arriva allo stomaco per poi tornare in esofago mediante il reflusso.

Forma gastrica: è la forma più frequente di Anisakiasi. Tra i sintomi sono riportati: dolori all'epigastrio, nausea e vomito. La porzione gastrica maggiormente interessata è la grande curvatura, a causa della presenza di numerose pliche e per la maggiore attività secretoria della mucosa. Numerosi soggetti associano anche forme orticarioidi diffuse (Anisakidosi gastro-allergica).

Forma intestinale: i sintomi associati a tale forma sono dolori di tipo colico con nausea, vomito e diarrea. Si possono presentare anche casi di flogosi dell'ileo dovuti all'impianto del parassita. Può inoltre essere interessato il colon (forma insolita) o l'appendice, con manifestazioni infiammatorie acute, a causa della penetrazione del parassita attraverso la mucosa e con presenza di coliche nella parte inferiore dell'addome.

Nelle forme acute, 24 ore dopo l'esordio dei sintomi, a livello ematico si associa eosinofilia non particolarmente marcata.



FORMA CRONICA

Il parassita, una volta penetrato nella parete della mucosa gastroenterica, induce la formazione di lesioni granulomatose o ascessuali. La reazione flogistica può essere imponente, con la formazione di un infiltrato di eosinofili e può determinare fenomeni occlusivi di varia entità, soprattutto a livello delle ultime anse dell'ileo. Possono essere presenti lesioni flemmonose.

I sintomi sono molto vari, in relazione alla sede e all'entità delle lesioni.

I soggetti colpiti possono presentare:

- difficoltà allo svuotamento gastrico;
- occlusione o pseudo-occlusione intestinale;
- versamento peritoneale;
- sintomatologia colitica;
- sangue occulto nelle feci.

Possono essere presenti anche forme paucisintomatiche con scarsa dolorabilità o forme completamente asintomatiche.

Il parassita penetrato nella parete gastrica o intestinale è osservabile per circa 4-5 settimane, successivamente inizia la degenerazione attraverso la calcificazione dello stesso, dopo circa 6 mesi dall'impianto.



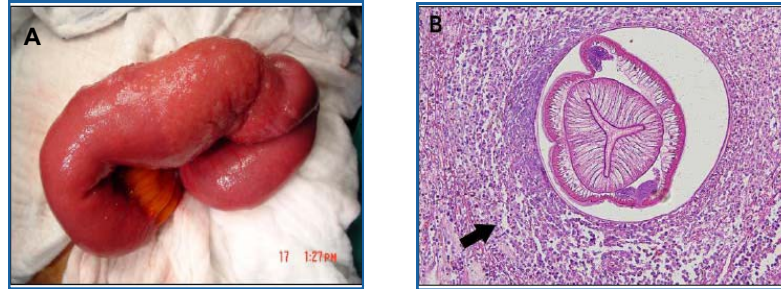


Figura 21: **A** Digiuno distale asportato a seguito di ostruzione intestinale
B Rilievo istopatologico: mucosa ileale con infiltrato di eosinofili attorno alla larva di *Anisakis* (Dong Baek Kang *et al.*, 2008)

FORME EXTRA-GASTROINTESTINALI O ECTOPICHE

Le forme extra-gastrointestinali si riscontrano quando il parassita riesce a perforare la parete gastrointestinale per migrare negli organi limitrofi. Il parassita, essendo in grado di sopravvivere fino a 2 mesi, può causare sintomi aspecifici. Istologicamente è possibile riscontrare un granuloma eosinofilo o un ascesso intorno alla larva di Anisakidae (fig. 21B). Nei casi di localizzazione a livello peritoneale, è possibile riscontrare larve vive che danno origine a dolori addominali diffusi.



MANIFESTAZIONE ALLERGICHE

Le forme allergiche si manifestano quando il soggetto interessato ha già avuto un precedente contatto con il parassita. Un secondo evento di esposizione è in grado di indurre manifestazioni di tipo allergico che possono essere caratterizzate da:

- Forma gastroallergica
- Reazione anafilattica

La forma gastroallergica si presenta nell'11% dei casi di Anisakidosi gastrica ed è causata dagli antigeni parassitari, in particolare quelli di superficie presenti sulla cuticola del parassita.

Anche gli antigeni escretivi/secretivi (Ag ES), proteine rilasciate dal parassita con il ruolo di enzimi digestivi ad azione istolitica, hanno potere allergizzante. Essi sono i primi antigeni ad essere rilevati fino a tre giorni dall'inizio dei sintomi. Questi antigeni sono termoresistenti per cui, anche se il calore riduce notevolmente la capacità allergizzante, essa viene in parte mantenuta.



La reazione anafilattica viene innescata dalle IgE, presenti sulla membrana del mastocita, nel momento in cui vengono a contatto con l'allergene parassitario. Le manifestazioni cliniche possono essere congiuntivite, asma e shock anafilattico.

Le manifestazioni allergiche si presentano con maggiore frequenza nei soggetti che soffrono di orticaria cronica oppure come malattia professionale in soggetti che manipolano quotidianamente prodotti ittici freschi o farina di pesce. Casi di positività ad *Anisakis* spp. in soggetti che avevano ingerito carne di pollo sono stati riportati in letteratura (Armentia et al. 2006). Ciò è dovuto al fatto che molto spesso il pollame viene alimentato con farina di pesce (in particolare farina di aringhe) per cui questi allergeni riescono a rimanere attivi dopo la digestione in quanto resistenti alla pepsina e alla cottura.

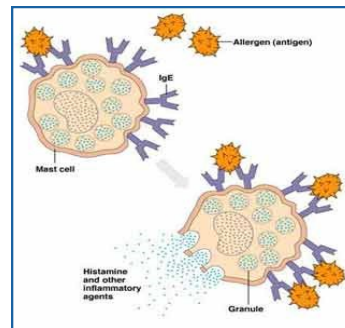


Figura 22: Patogenesi della reazione di ipersensibilità tipo I mediata da IgE.



DIAGNOSI

I sintomi dell' Anisakiasi sono aspecifici per cui la malattia spesso non viene diagnosticata. Uno studio effettuato da Sakanari e McKerrow (1989) rileva che oltre il 60% dei casi di Anisakiasi ha subito errata diagnosi di appendicite, addome acuto, cancro gastrico o Morbo di Crohn. La diagnosi clinica va dunque effettuata mediante endoscopia o esami radiologici e mediante l'utilizzo di saggi immunologici per la diagnosi indiretta, quali lo *skin-prick test*, la fissazione del complemento, l'immunofluorescenza indiretta, l'immunodiffusione, l'immunolettroforesi, il test di Radioallergoassorbimento (*RAST*) e l'*ELISA*. Di tutti i saggi siero diagnostici, il *RAST* è il più sensibile e specifico, considerando che l'interpretazione delle prove sierologiche può essere difficoltosa, in quanto si possono verificare reazioni crociate con antigeni correlati ad altri nematodi (ad es. *Ascaris* e *Toxocara*), rilevando falsi positivi. Per l'Anisakiasi gastrica acuta la rimozione endoscopica mediante gastroscopia o colonscopia è il trattamento d'elezione per la rimozione del parassita, in funzione delle complicazioni che possono scaturire dalla patologia, è necessario ricorrere alla rimozione chirurgica di granulomi o somministrazione di corticosteroidi per via sistemica in grado da ridurre l'infiammazione.



Non esistono ad oggi trattamenti farmacologici specifici mirati all'eliminazione dei parassiti in vivo, ma è in fase di studio l'azione di antielmintici quali il Tiabendazolo, l'Albendazolo e l'Ivermectina. Nonostante l'efficacia di tali farmaci sulle larve vive, rimane il problema degli effetti collaterali che ne derivano quando utilizzati *in vivo*. Il "trattamento" più efficace pertanto rimane sempre la prevenzione.

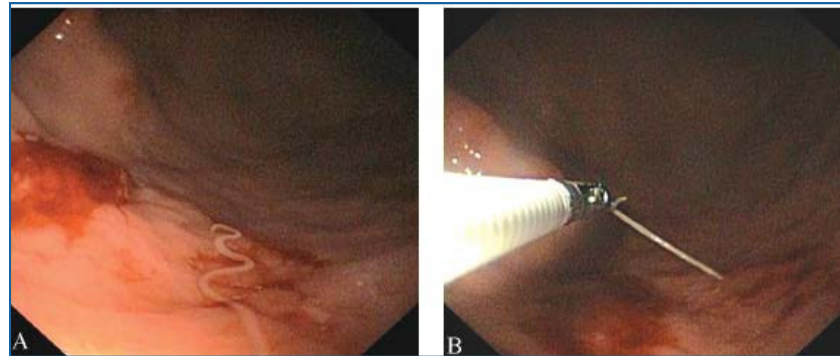


Figura 23: **A** Visualizzazione endoscopica di una larva in movimento a livello di mucosa antrale pilorica.
B Rimozione della larva adesa alla mucosa con pinze endoscopiche (Zullo *et al.*, 2010).



DIAGNOSTICA BIOMOLECOLARE

La diagnosi biomolecolare viene effettuata presso i laboratori del C.Re.N.A successivamente alla ricerca visiva diretta o mediante stereomicroscopio delle larve di Anisakidae in campioni di pesce fresco o marinato, preparazioni gastronomiche, alimenti per bambini a base di pesce e parassiti estratti per via endoscopica da soggetti ospedalizzati. Essa si basa sulla ricerca di geni specifici che consentono la corretta identificazione delle specie a cui le larve appartengono.



Figura 24: Filetti di alici fresche

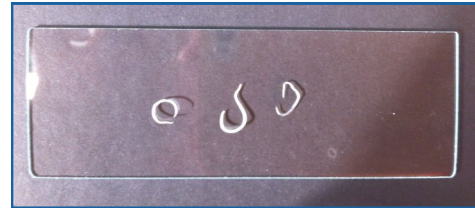


Figura 25: Larve di *Anisakis*



PCR-RFLP

La PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), ossia l'amplificazione di DNA specifico e la successiva restrizione mediante l'utilizzo di enzimi di restrizione (*Hinf* I, *Hha*I, *Taq* I), è un metodo biomolecolare che consente l'identificazione di specie appartenenti al genere *Anisakis*, raggiungendo una notevole sensibilità nel rilevare minime variazioni genetiche (Costa *et al.* 2012). La metodica si basa sull'analisi dei frammenti di restrizione ottenuti dopo l'amplificazione della regione genomica nucleare che comprende la subunità ribosomiale 5.8 S ed i due spaziatori ITS-1 e ITS-2.

Questa metodica molecolare permette un utile approccio per l'identificazione di specie appartenenti al genere *Anisakis*, sia vicine che distanti dal punto di vista genetico, in quanto gli spaziatori ribosomiali mostrano alti livelli di mutazioni puntiformi interspecifiche in presenza di variazioni intraspecifiche molto basse (Zhu *et al.*, 1999).

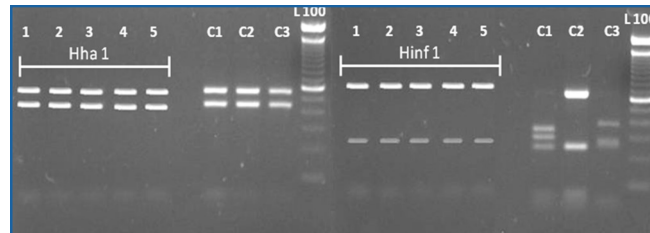


Figura 26: RFLP pattern delle regioni ITS ottenuto con enzimi di restrizione *Hha*I e *Hinf*I.



PCR Real-Time

La metodica PCR *real-time* viene utilizzata soprattutto per matrici ittiche come pesci interi o sfilettati, preparazioni gastronomiche (bastoncini o cotolette di pesce, pasta di acciuga e alici marinate) e prodotti per la prima infanzia. Questa tecnica consente di ottenere una grande quantità di copie di DNA a partire anche da una singola molecola presente nel campione. La reazione di amplificazione selettiva e ad elevata sensibilità, consente di rilevare piccolissime quantità di DNA target anche in presenza di DNA non specifico. Queste caratteristiche rendono la PCR real-time uno strumento d'elezione per l'individuazione di frammenti di parassiti eventualmente presenti negli alimenti ittici.

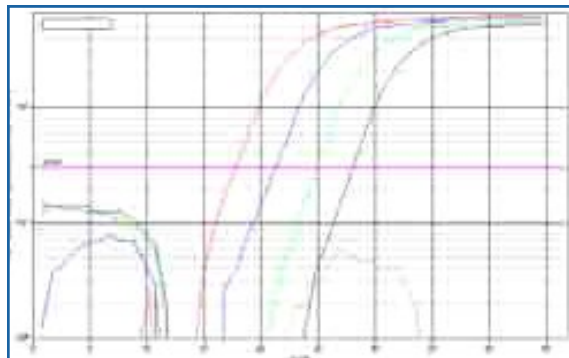


Figura 27: PCR Real-Time (Costa et al. 2013)



PREVENZIONE

Alla luce di quanto riportato in precedenza possiamo considerare la prevenzione come lo strumento più efficace per evitare l'Anisakiasi. È fondamentale quindi procedere sempre con la sensibilizzazione del consumatore e degli operatori di settore attraverso l'educazione sanitaria, l'eviscerazione dopo la pesca per evitare la migrazione delle larve nel muscolo, il controllo visivo e i trattamenti del prodotto ittico idonei a devitalizzare le larve come:

Salagione:

Le larve di anisakidi sono sensibili a questa tipologia di trattamento solo se effettuato rispettando determinati parametri. È stato dimostrato che il tempo massimo di sopravvivenza delle larve presenti in filetti di alici posti in salagione (concentrazioni di 8-9% di sale), è di 6 settimane.



Figura 28: Sarde salate.



Marinatura:

E' basata sull'utilizzo di soluzioni contenenti acqua, sale ed acidi organici quali aceto, vino e succo di limone (Figura 29).



Figura 29: Prodotti ittici marinati.

La marinatura, oltre ad avere un effetto antibatterico, modifica l'aspetto e la consistenza dei prodotti ittici, conferendogli proprietà organolettiche caratteristiche. Studi effettuati a partire dagli anni '60, hanno dimostrato che le larve di *Anisakis* spp. sono molto resistenti ai tradizionali metodi di marinatura, di fatto rappresentano gli alimenti maggiormente implicati nei casi di Anisakidosi in Italia e Spagna. Per cui si ritiene opportuno, al fine di abbattere il pericolo di Anisakiasi, affiancare le comuni tecniche di marinatura ad adeguate procedure di congelamento (-15 °C per 96h; -20 °C per 24h; -35 °C per 15h al cuore del prodotto), ritenute le tecnologie in grado di uccidere con certezza il parassita.



Congelamento:

La sopravvivenza delle larve appartenenti alla famiglia Anisakidae dipende dalla combinazione di tre parametri quali:

- la temperatura;
- il tempo necessario affinché questa venga raggiunta uniformemente in ogni parte del prodotto;
- il mantenimento di tale temperatura per un tempo adeguato, al fine di provocare la morte dei parassiti.

Il congelamento previsto dal Regolamento (CE) N. 853/2004 prevede il trattamento dei prodotti ittici ad una temperatura di $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 24 ore al cuore del prodotto; trattamenti analoghi, ma con rapporti tempo/temperatura differenti sono quelli a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 96 ore e a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 15 ore. Per cui, in caso di congelamento effettuato a temperature e tempi anche solo lievemente differenti da quelli indicati, si rischia di non devitalizzare tutte le larve presenti.



Cottura:

Diversi studi hanno dimostrato che, sottoponendo il prodotto ittico a temperature superiori a 60 °C per almeno 1 minuto, viene garantita la devitalizzazione delle larve.

Anche nella cottura è necessario prendere in considerazione il rapporto tempo/temperatura al cuore del prodotto; ad esempio un trancio di pesce di 3 cm di spessore deve essere cotto a 60 °C per 10 minuti al fine di assicurare la morte di tutte le larve (Wootten e Cann, 2001).



Figura 30: Prodotti ittici sottoposti a cottura.



Affumicatura:

Il trattamento di affumicatura, caratterizzato dall'esposizione dell'alimento al fumo prodotto dalla combustione di differenti tipi di legname in assenza di fiamma e in atmosfera povera di ossigeno, può essere effettuato a caldo oppure a freddo. Il trattamento a caldo con temperature di circa 70/80 °C per 3/8 ore, è in grado di assicurare la morte delle larve di *Anisakis* spp. (FDA/CFSAN, 2001). Invece l'affumicatura a freddo con temperature di circa 20/25 °C per tempi che vanno da molte ore ad alcuni giorni, risulta insufficiente a devitalizzare le larve (Khalil, 1969; Szostakowska et al., 2005). Per cui, così come per la procedura di marinatura è consigliabile, nei casi di affumicatura a freddo, un trattamento di congelamento preventivo al fine di ottenere un prodotto sicuro per la salute umana.



Figura 31: Camera d'affumicatura



NORMATIVA DI RIFERIMENTO

Normativa Comunitaria

REGOLAMENTO (CE) 1276/2011 - che modifica l'allegato III del regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio relativamente al trattamento per l'uccisione di parassiti vitali in prodotti della pesca destinati al consumo umano.



REGOLAMENTO (CE) 809/2011 - che modifica il regolamento (CE) n. 2074/2005 per quanto riguarda la documentazione di accompagnamento dei prodotti della pesca congelati importati direttamente da una nave frigorifero.

REGOLAMENTO (CE) N. 1020/2008 DELLA COMMISSIONE del 17 ottobre 2008 - che modifica gli allegati II e III del regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale e il regolamento (CE) n. 2076/2005 per quanto riguarda la marchiatura d'identificazione, il latte crudo e i prodotti lattiero-caseari, le uova e gli ovoprodotti e taluni prodotti della pesca.



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 e all'organizzazione di controlli ufficiali a norma dei regolamenti 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.

REGOLAMENTO (CE) 854/2004 -Organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano - Allegato III Prodotti della pesca.

REGOLAMENTO (CE) N. 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.- Sez. VIII Prodotti della pesca.

REGOLAMENTO (CE) N. 852/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 - sull'igiene dei prodotti alimentari.



Normativa nazionale, circolari e note ministeriali

D.M. 17 luglio 2013 Ministero della Salute - Informazioni obbligatorie a tutela del consumatore di pesce e cefalopodi freschi e di prodotti di acqua dolce, in attuazione dell'articolo 8, comma 4 del decreto legge 13 settembre 2012 n. 158, convertito, con modificazioni, dalla legge 8 novembre 2012, n.189. (Pubblicato nella Gazz. Uff. 10 agosto 2013, n. 187).



Figura 32: Esempio di cartello da esporre nei luoghi di vendita



L. 8-11-2012 n. 189 -Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 13 settembre 2012, n. 158, recante disposizioni urgenti per promuovere lo sviluppo del Paese mediante un più alto livello di tutela della salute. (Pubblicata nella Gazz. Uff. 10 novembre 2012, n. 263, S.O.).

D.L. 13-9-2012 n. 158- Disposizioni urgenti per promuovere lo sviluppo del Paese mediante un più alto livello di tutela della salute. (Pubblicato nella Gazz. Uff. 13 settembre 2012, n. 214).

Decreto 4-7-2011 del Direttore Generale della pesca marittima e dell'acquacoltura "Invito alla presentazione di progetti di ricerca per l'attuazione del primo programma nazionale triennale della pesca e dell'acquacoltura" (Pubblicato nella Gazz. Uff. 19 luglio 2011, n. 166)

DGSAN 0004380-P-17/02/2011 -articolo 5 della legge 283 - Presenza di *Anisakis*.

DGSAN 0004379-P-17/02/2011 - Chiarimenti concernenti alcuni aspetti applicativi del Reg CE 853/2004 in materia di vendita e somministrazione di preparazioni gastronomiche contenenti prodotti della pesca destinati ad essere consumati crudi o praticamente crudi.



DGSAN 0010776-P-19/05/2008 -Riscontro di larve di *Anisakis* in prodotti della pesca.

DECRETO LEGISLATIVO 6 novembre 2007, n. 193 "Attuazione della direttiva 2004/41/CE relativa ai controlli in materia di sicurezza alimentare e applicazione dei regolamenti comunitari nel medesimo settore".

Intesa Stato–Regioni del 16 novembre 2006 (Rep. Atti n. 2674/CSR). Linee guida sui prodotti della pesca e la nuova regolamentazione comunitaria.

D.M. 27-8-2004 Ministero della salute "Istituzione di nuovi Centri di referenza nazionali nel settore veterinario". (Pubblicato nella Gazz. Uff. 22 febbraio 2005, n. 43).

Ordinanza 12 maggio 1992 -Misure urgenti per la prevenzione delle parassitosi da *Anisakis* (pubblicato in G.U.R.I. Serie Generale n. 121 del 25 maggio 1992).

CODICE PENALE, Art. 444 - Commercio di sostanze alimentari nocive.



Circolare 11 marzo 1992 n. 10 -Direttive e raccomandazioni in merito alla presenza di larve di *Anisakis* nei pesci (pubblicato in G.U.R.I. Serie Generale n. 62 del 14 marzo 1992).

D.M. 4-8-1988 n. 375 Ministero dell'industria, del commercio e dell'artigianato Norme di esecuzione della legge 11 giugno 1971, n. 426, sulla disciplina del commercio. (Pubblicato nella Gazz. Uff. 31 agosto 1988, n. 204, S.O.)

L. 11-6-1971 n. 426 Disciplina del commercio. (Pubblicata nella Gazz. Uff. 6 luglio 1971, n. 168).



Normativa regionale

Abruzzo

Det. Reg. 30-03-2011, n. DG21/42

Piano Pluriennale Regionale Integrato dei Controlli (PPRIC) sulla Sicurezza Alimentare e Sanità Pubblica Veterinaria "IL LIBRO DELLE REGOLE" della Regione Abruzzo 2011-2014.

(Pubblicata nel B.U. Abruzzo 8 luglio 2011, n. 41 speciale).

Campania

Decr.reg. 22-03-2011, n. 22 2.

Approvazione del Piano sanitario regionale ai sensi del punto t) della delibera della Presidenza del Consiglio dei Ministri del 24 aprile 2010.

(Pubblicato nel B.U. Campania 27 maggio 2011, n. 32).

Friuli-Venezia Giulia

D.P.Reg. 16-04-2013, n. 084/Pres. - Piano del Governo del Territorio - Rapporto ambientale (RA) relativo alla procedura di Valutazione ambientale strategica (VAS) - Ottobre 2012

(Pubblicato nel B.U. Friuli-Venezia Giulia 2 maggio 2013, n. 18, S.O. n. 20).



Lazio

Delib.G.R. 06-04-1999, n. 1944 Approvazione linee guida per la sorveglianza delle malattie infettive trasmesse da alimenti e la conduzione di indagini epidemiologiche in caso di tossinfezioni alimentari.

(Pubblicata nel B.U. della Regione Lazio 30 giugno 1999, n. 18, S.O. n. 4).

Puglia

Delib.G.R. 17-09-2013, n. 1675 Indirizzi per l'adozione di un Sistema per la sorveglianza e il controllo delle patologie dell'uomo causate da *Anisakis spp.* in Puglia. (Pubblicata nel B.U. Puglia 9 ottobre 2013, n. 131).

Sicilia

Dec. Ass. 02-12-2011 Approvazione del Piano regionale di controllo ufficiale sulla contaminazione microbiologica degli alimenti per il quadriennio 2011-2014. (Pubblicato nella Gazz. Uff. Reg. Sic. 27 gennaio 2012, n. 4).

Toscana

Delib.G.R. 27-12-2004, n. 1397 Controlli minimi sui prodotti della pesca ed i molluschi eduli lamellibranchi. (Pubblicata nel B.U. Toscana 19 gennaio 2005, n. 3).



Veneto

Circ.P.G.R. 02-01-1995, n. 1

Norme sanitarie in materia di produzione e commercializzazione dei prodotti della pesca. -Linee di indirizzo applicative del D.Lgs. 30 dicembre 1992, n. 531.



ILLUSTRAZIONE PROCESSO DI LAVORAZIONE:
FASI DI RICERCA ED IDENTIFICAZIONE LARVE DELLA FAMIGLIA ANISAKIDAE

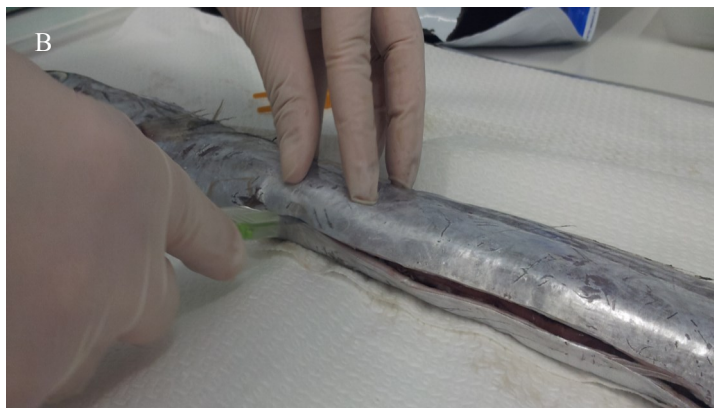


Figura 32: A. Campione di spatola (*Lepidopus caudatus*) esaminato presso il laboratorio del C.Re.N.A. B. Apertura del campione.





Figura 33: A. Esame visivo dei visceri. B. Lavaggio larve prelevate in soluzione fisiologica



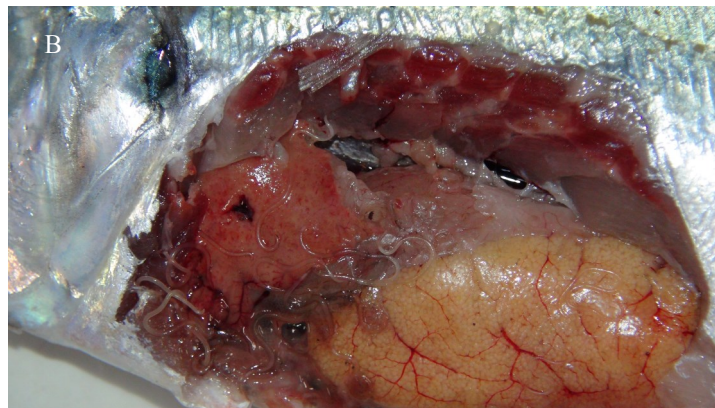


Figura 34: A. Campione di suro (*Trachurus trachurus*) esaminato presso i laboratori del C.Re.N.A. B. Esame visivo dei visceri.



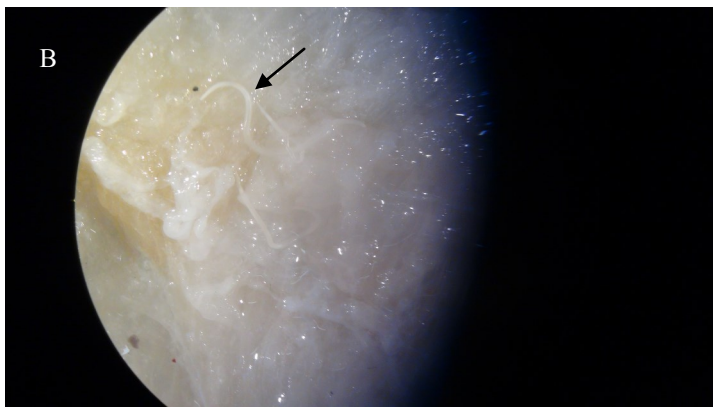


Figura 35: A. Ricerca allo stereomicroscopio di larve nella muscolatura
B. Visuale allo stereomicroscopio



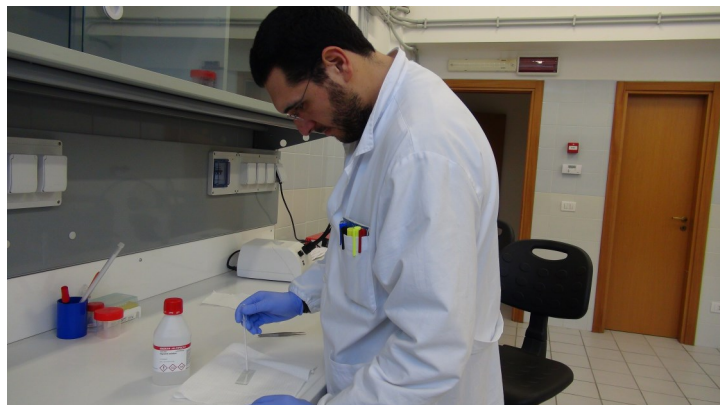
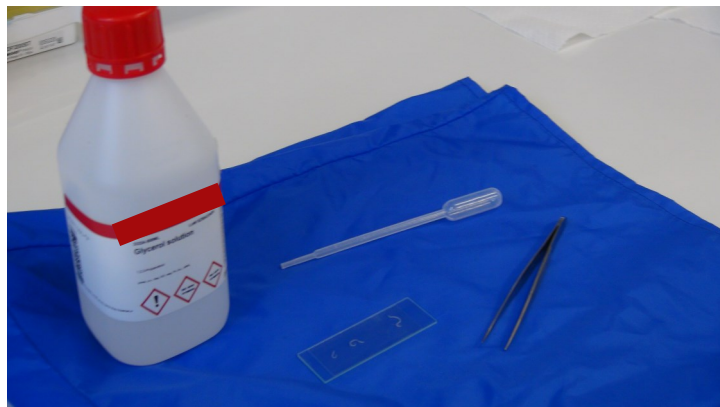


Figura 36: Chiarificazione dei parassiti in glicerolo per la visualizzazione al microscopio ottico



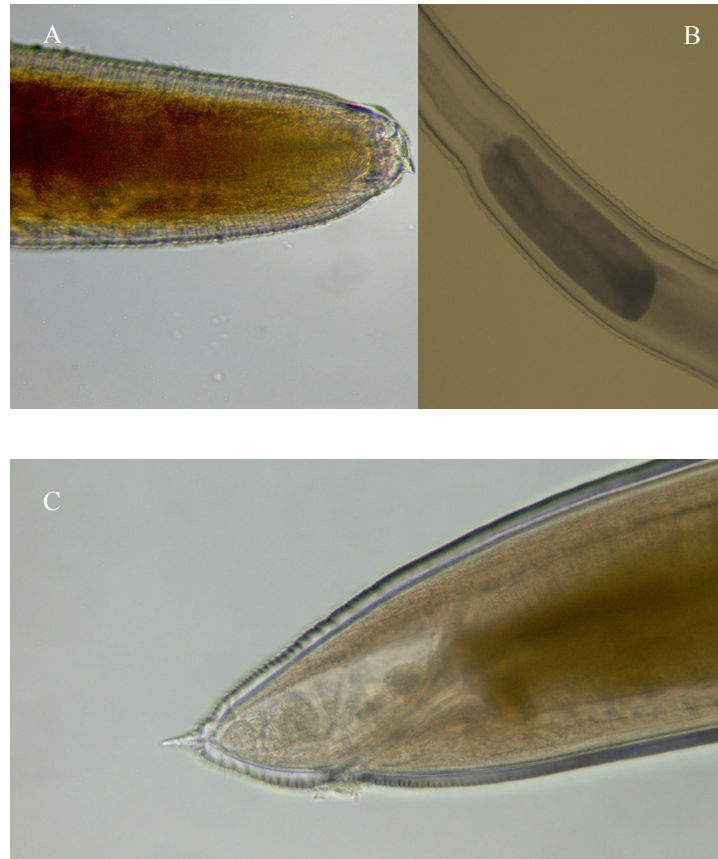


Figura 37: Identificazione dei caratteri morfologici al M.O. **A.** Estremità anteriore. **B.** Ventricolo
C. Estremità posteriore



CONCLUSIONI

Negli ultimi anni il nostro Paese ha registrato un aumento del consumo di cibi esotici come “sushi o sashimi” determinando un proporzionale accrescimento del rischio di assumere prodotti ittici parassitati da larve di Anisakidi non correttamente trattati.

Il Centro di Riferenza Nazionale Anisakiasi (C.Re.N.A.), promuove una costante azione di informazione tematica e specialistica al fine di prevenire, diagnosticare e curare la zoonosi in questione. Il presente volume si prefigge il compito di fornire delle linee guida essenziali affinché il consumatore finale, anche attraverso il supporto e la consulenza dei medici di base, dietisti, nutrizionisti, specialisti gastroenterologi, etc., riceva informazioni adeguate e nozioni scientifiche di base sulla materia.

Infatti le notizie su tale problematica reperite facilmente sul web determinano un approccio “qualunquistico” che rischia di ingenerare sul consumatore finale confusione, paure ingiustificate per notizie allarmistiche e danni all’economia assolutamente spropositati.

Un approccio scientifico alla materia rivolto a tutti gli addetti ai lavori e agli stessi consumatori, può orientare invece verso la giusta direzione. Tale scelta guidata e consapevole ha il duplice fine di potenziare il comparto ittico tutelando prioritariamente la salute del consumatore.



Nella logica sopra descritta i laboratori specialistici del Centro di Referenza Nazionale Anisakiasi (C.Re.N.A.), con sede presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A.Mirri", svolgono la propria attività garantendo, grazie alla comprovata competenza dei professionisti esperti che vi operano, le esigenze di utenti e *stakeholders*.

IL DIRETTORE DEL DIPARTIMENTO ALIMENTI
RESPONSABILE DEL C.Re.N.A
Dr. Vincenzo Ferrantelli





Si ringraziano per la Collaborazione

Antonella Costa
Angela Alongi
Gaetano Caldara
Gaetano Cammilleri
Giuseppe Giangrosso
Innocenzo Ezio Giangrosso
Paola Palumbo
Michele Chetta
Stefania Graci

il Responsabile
UFFICIO RELAZIONI CON IL PUBBLICO
Liliana Castelli
Tel. 091 65 65 222 7 Fax. 091 65 63 568
e-mail: urp@izssicilia.it

per il Progetto Grafico
Valeria Vitale Badaco

