

Pilot project to set up a control programme on fishery products

Guida Benedetta Richelmi,¹
 Marzia Pezzolato,¹ Stefano Gili,²
 Silvia Gallina,¹ Lucia Decastelli,¹
 Renata Tarasco,¹ Maria Cesarina Abete,¹
 Francesco Ingravalle,¹ Laura Serracca,¹
 Davide Pavino,¹ Barbara Vivaldi,¹
 Maria Vittoria Riina,¹ Pier Luigi Acutis,¹
 Marino Prearo,¹ Maria Caramelli,¹
 Elena Bozzetta¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino;
²ASL TO 1, Torino, Italy

Abstract

Authentication of fish as fresh or frozen-thawed is compulsory because of the widespread fraudulent practice of retailing fish products as fresh, when they have actually been frozen. Moreover, according to EC Regulations 853/2004 and 1276/2011, fish intended for raw consumption has to be deep-frozen before usage, to protect consumers against Anisakiasis. In this study, a food business operator set an example of good quality control by collaborating with health authorities and an official laboratory in charge of food control, to evaluate the feasibility of a further integrated regional plan on fish safety. Furthermore, differences in microscopic patterns related to freezing time complying (24 h) and not complying (12 h) with legislation in force were evaluated. Ten samples obtained from red and white-meat fish, and based on real production of the food business, were identified to evaluate the histological method performance in correctly classifying fish as fresh/frozen as well as the microbiological and chemical safety issues possibly related to fishery products. For two samples, species identification was needed. Based on the histological method, one out of ten fish was not fresh, though the supplier claimed all fish to be fresh; the others, after freezing, could be characterised microscopically as frozen and a borderline P-value was found between different freezing times. Microbiological parameters and species identification resulted compliant, while flesh from a tuna fish (*Euthynnus alletteratus*) contained mercury residues three times higher than the legally permitted level. Our results highlight the reliability of an integrated approach to control fishery products frauds.

Introduzione

I regolamenti CE 104/2000 (Commissione Europea, 2000), 2065/2001 (Commissione Europea, 2001) e 404/2011 (Commissione Europea, 2011a) dettano i requisiti fondamentali nella fase di commercializzazione dei prodotti ittici e stabiliscono le informazioni che devono essere necessariamente fornite al consumatore. In particolare, l'art. 68 del Reg. CE 404/2011 (Commissione Europea, 2011a) è molto chiaro nel definire quando e come i prodotti ittici debbano riportare la dicitura *scongelato*. Si configura quindi una frode commerciale allorché un pesce dichiarato fresco o mancante dell'apposita dicitura in etichetta sia scongelato. Il caso contrario, che ha delle ripercussioni di ordine sanitario, è quello in cui un prodotto da consumarsi crudo non sia stato precedentemente abbattuto termicamente al fine di uccidere eventuali parassiti presenti, come previsto dal Reg. CE 853/2004 (Commissione Europea, 2004), modificato dal Reg. CE 1276/2011 (Commissione Europea, 2011b). In entrambi i casi, il metodo istologico sul muscolo di pesce rappresenta un efficace ausilio per discriminare il pesce fresco dal pesce scongelato (Ayala *et al.*, 2005; Bozzetta *et al.*, 2012; Pavlov *et al.*, 2008).

A partire dal 2012, il Piano Regionale Integrato dei controlli sulla Sicurezza Alimentare (PRISA) dedicato ai prodotti ittici prevede la verifica della prevalenza delle frodi di dichiarazione dello stato di conservazione del pesce tramite il metodo istologico e di sostituzione di specie mediante indagini genetiche insieme alla valutazione di una serie di parametri microbiologici e chimici.

L'obiettivo del nostro lavoro è, tramite l'applicazione di un progetto a piccola scala nell'ambito di una realtà commerciale virtuosa, di testare la *macchina operativa* che collaborerà all'interno del piano a larga scala sopraccitato e comprendere più da vicino la natura delle problematiche che possono riguardare i prodotti ittici in una piccola realtà commerciale. Ulteriore obiettivo è valutare se esistano differenze nella tipologia delle lesioni istologiche da congelamento, qualora il prodotto ittico non subisca il processo completo di abbattimento termico, dopo aver verificato la veridicità dello stato di conservazione dichiarato all'arrivo presso l'esercizio commerciale.

Materiali e Metodi

Disegno dello studio e raccolta dei campioni

Il disegno dello studio ha previsto il prelievo di 10 campioni di pesce dichiarati freschi all'arrivo presso l'esercizio commerciale,

Correspondence: Elena Bozzetta, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, via Bologna 148, 10154 Torino, Italy.
 Tel: +39.011.2686361 - Fax: +39.011.2686362.
 E-mail: elena.bozzetta@izsto.it

Key words: Frozen/fresh fish, Histological method, Control programme, Food safety.

Conflict of interests: the authors declare no potential conflict of interests.

Received for publication: 15 January 2013.

Revision received: 1 March 2013.

Accepted for publication: 5 March 2013.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License (by-nc 3.0).

©Copyright G.B. Richelmi *et al.*, 2013
 Licensee PAGEPress, Italy
 Italian Journal of Food Safety 2013; 2:e25
 doi:10.4081/ijfs.2013.e25

distribuiti indifferentemente tra pesci a carne rossa e pesci a carne bianca e rappresentativi delle specie ittiche che vengono più frequentemente vendute o lavorate per la ristorazione presso l'esercizio commerciale che ha collaborato al progetto, ovvero: 4 palamite (*Sarda sarda*), 2 tonni alalunga (*Thunnus alalunga*), 2 salmoni (*Salmo salar*), 1 tonnetto alletterato (*Euthynnus alletteratus*) ed 1 rombo chiodato (*Psetta maxima*).

Quantitativi idonei e nei tempi previsti da ciascuna delle analisi successivamente riportate sono inoltre stati prelevati dagli stessi pesci sopra indicati prima dell'abbattimento termico e dopo essere stati sottoposti dall'operatore del settore alimentare stesso ad abbattimento termico conformemente alla legislazione vigente (-20°C per 24 h). Il disegno sperimentale ha inoltre previsto un prelievo intermedio di matrice dopo 12 h di congelamento.

Esame istologico

Sono stati prelevati tre campioni di muscolo di circa 40 g di peso per ciascuno dei 10 pesci campionati. Ognuno dei campioni rispondeva ad una delle tre diverse condizioni richieste dallo studio [si consideri che per abbattimento termico/congelamento si intende una temperatura di -20°C (±2°C) e che lo scongelamento è avvenuto a 4°C in condizioni controllate per circa 7 h]. Di seguito sono descritte le tre diverse tipologie di ciascun campione di muscolo di pesce sottoposto ad analisi istologica: i) 0 h di abbattimento termico, quindi all'arrivo del prodotto dichiarato fresco; ii) 12 h di abbattimento termico e successivo scongelamento; e iii) 24 h di abbattimento termico e successivo scongelamento.

Dopo fissazione in formaldeide al 4% neutra

(tamponata con fosfati 0,05 M) sono state ottenute 4 sezioni da ogni singolo campione. Quindi, dai 10 pesci iniziali sono stati ottenuti un totale di 120 sezioni. Si è quindi proceduto, dopo le routinarie tecniche istologiche e colorazione con ematossilina ed eosina (EE), a stabilire innanzitutto se la freschezza dichiarata all'arrivo del pesce presso l'esercizio commerciale fosse reale o fittizia; si è quindi approfondita l'analisi andando ad osservare la presenza o l'assenza di lesioni da congelamento, ovvero di microvacuoli (grandi meno della metà della fibrocellula muscolare) e macrovacuoli (grandezza maggiore di metà della fibrocellula muscolare). Il quadro istologico caratterizzante un campione fresco ed uno congelato è esemplificato dalla Figura 1.

In particolare, si è proceduto inizialmente verificando l'eventuale presenza di lesioni da congelamento in ciascuno dei campioni *0 h di abbattimento termico*, al fine di poter escludere dalla valutazione successiva i pesci già pervenuti scongelati all'arrivo presso l'esercizio commerciale.

Pertanto, si è attribuito a ciascun preparato istologico di ogni singolo campione sottoposto a 12 e 24 h di abbattimento termico un *grading* di distribuzione delle due tipologie di vacuoli in tre classi: rari (focali), sparsi (multifocali), diffusi. Per rari s'intende la presenza di almeno una lesione in 1-4 dei 12 campi microscopici osservati; per multifocale si intende la presenza di lesioni caratteristiche in 5-8 campi osservati; e per diffusa si intende la presenza di vacuoli in 9-12 campi microscopici osservati. I dati sono stati quindi inseriti in un foglio di calcolo appositamente creato.

L'analisi statistica dei dati raccolti è stata condotta con software Stata:Release 11.2, costruendo un modello di regressione logistica ordinale ad effetti casuali in modo da verificare se, sulla base della caratterizzazione ordinale delle lesioni istologiche, emergessero differenze statisticamente significative tra muscoli di pesce sottoposti a periodi di congelamento diversi (24 e 12 h), identificando nelle diverse sezioni la componente *random* del modello gerarchico.

Analisi microbiologiche

Per le analisi microbiologiche sono stati prelevati mediante utensili sterili e per ciascuno degli otto pesci campionati (due pesci non sono stati analizzati a causa della matrice insufficiente), due porzioni di circa 100 g di muscolo, in modo da verificare i parametri microbiologici nelle seguenti condizioni: i) campione fresco, non sottoposto ad abbattimento termico; e ii) campione sottoposto ad abbattimento termico per 24 h a -20°C e conseguente scongelamento in condizioni controllate a temperatura di 4°C per 7 h circa. In quest'ultima condizione, entrambe le fasi sono avvenute presso l'esercizio commerciale di

riferimento e tale procedura aveva l'obiettivo di riprodurre le condizioni cui viene sottoposto il pesce da consumarsi crudo.

I campioni sono stati conservati a 4°C fino all'esecuzione delle analisi.

Le analisi effettuate su entrambi i tipi di campione per ciascun pesce sono state le seguenti: *Escherichia coli* (*E. coli*) -glucuronidasi positivo (ISO 16649-2:2001; ISO, 2001); carica mesofila totale (CMT) a 30°C (ISO 4833:2003; ISO, 2003b); stafilococchi coagulasi positivi (ISO 6888-2/Amd 1:2003; ISO, 2003a); *Salmonella* spp. (ISO 6579: 2002/Corr. 1:2004; ISO, 2004); *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae* (ISO/TS 21872-1:2007; ISO, 2007).

La scelta di tali parametri è stata effettuata per seguire quanto previsto dal PRISA 2012 della Regione Piemonte.

È stata effettuata inoltre la ricerca di Norovirus sui dieci campioni con l'utilizzo di una metodica *real-time polymerase chain reaction* (RT-PCR) fornita dal laboratorio nazionale di riferimento (Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia). Il quantitativo di matrice richiesto da ciascuna analisi effettuata è stato di circa 50 g.

Analisi chimiche

La ricerca dei residui di mercurio è stata effettuata in nove campioni precedentemente congelati per 24 h a -20°C (un campione non è stato analizzato per insufficienza di matrice).

Per ciascun campione la quantità di muscolo prelevato era variabile dai 100 ai 400 g, a seconda delle dimensioni iniziali del pesce. È stata utilizzata una metodica interna accreditata: *thermal decomposition amalgamation atomic adsorption spectroscopy* (TDA-AAS).

La ricerca dell'amina vasoattiva istamina è

avvenuta in un quantitativo di matrice di circa 50 g, previo congelamento della matrice per circa 24 h a -20°C. Tale esame è stato effettuato sulle specie target, per un totale di sette analisi (2 tonni alalunga, 4 palamite, 1 tonnetto alletterato).

La metodica interna utilizzata, *high performance liquid chromatography with diode-array detection* (HPLC/DAD), è accreditata.

Identificazione di specie

È stata effettuata l'identificazione biomolecolare di specie per 2 pesci (un rombo chiodato e una palamita) che al momento del campionamento presentavano caratteristiche morfologiche tali da rendere dubbia la veridicità della specie dichiarata dall'etichetta (Manzoni e Tepedino, 2008). La metodica, validata e accreditata, sfrutta la tecnica *forensically informative nucleotide sequencing* (FINS) che combina il sequenziamento dei marcatori genetici *cytb* e/o *COI* caratteristici per ciascuna specie animale e l'analisi filogenetica (Barlett e Davidson, 1992).

La quantità necessaria all'effettuazione dell'analisi è di circa 10 g. I campioni sono stati conservati a -20°C fino all'effettuazione dell'analisi.

Risultati

Esame istologico

Nove pesci pervenuti presso l'attività come freschi sono risultati tali all'esame istologico, ovvero non presentavano né microvacuoli né macrovacuoli. All'esame istologico, un campione di tonno alalunga è risultato già congelato al momento della consegna presso l'esercizio

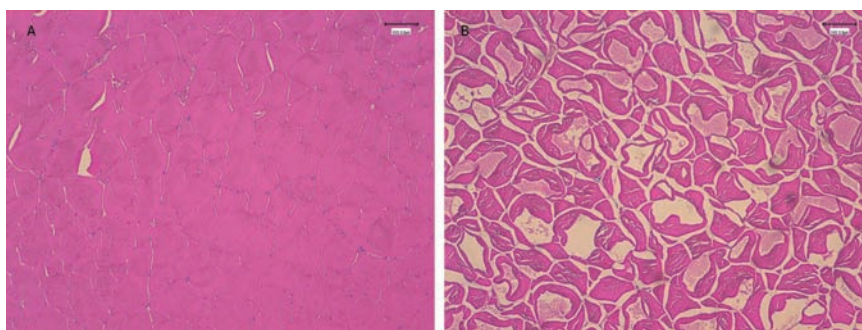


Figura 1. Quadri istologici caratteristici in un campione fresco (A) e in un campione congelato (B). In A), le fibrocellule muscolari sono integre, non presentando le tipiche lesioni da congelamento, si tratta infatti di un campione di tonno alalunga non sottoposto ad abbattimento termico (colorazione con ematossilina ed eosina). In B), si osservano chiaramente le lesioni da congelamento nel campione di tonno alalunga che aveva subito un abbattimento termico per 24 h a -20°C. I macrovacuoli si estendono per più della metà del diametro della fibrocellula muscolare, i microvacuoli sono definiti tali se occupano meno della metà della fibrocellula muscolare (colorazione con ematossilina ed eosina).

commerciale, e pertanto è stato escluso da ulteriori valutazioni. Il giudizio per i nove campioni conformi era unitario per *cluster* di preparati istologici nelle stesse condizioni di trattamento sperimentale (congelati e non), ovvero in ciascun gruppo di 4 preparati istologici di pesce fresco non erano presenti vacuoli o lesioni ambigue. Al contrario, in seguito a congelamento per 12 e 24 h erano sempre presenti microvacuoli e macrovacuoli, o almeno uno dei due tipi di lesione. Le valutazioni della presenza e della distribuzione dei microvacuoli e dei macrovacuoli, a seconda del numero di ore di congelamento della massa muscolare, sono sintetizzate nella Tabella 1.

L'analisi statistica effettuata sulla distribuzione delle lesioni istologiche dopo 12 e 24 h di abbattimento termico ha permesso di osservare una differenza al limite della significatività statistica ($P=0,05$) tra i due tipi di congelamento.

Analisi microbiologiche

Tutti i campioni analizzati hanno evidenziato piena conformità; non si è mai rilevata la presenza di germi patogeni, il conteggio di *E. coli* e stafilococchi coagulasi positivi si è sempre mantenuto al di sotto del *limit of detection* (LOD) del metodo utilizzato, e il conteggio della carica batterica totale ha evidenziato

livelli di contaminazione accettabili. I risultati, espressi secondo quanto previsto dalla ISO 7218:2007 (ISO, 2007), sono riassunti nella Tabella 2.

In nessuno dei campioni analizzati, inoltre, è stata evidenziata la presenza di Norovirus.

Analisi chimiche

La quantificazione del mercurio ha prodotto un risultato non conforme, relativo ad un tonnetto alletterato, per il quale il valore era di 2,7 mg/kg all'interno del campione di massa

muscolare di circa 300 g analizzato. I risultati sono sintetizzati nella Tabella 3.

Per quanto riguarda l'istamina, da nessuno dei sette campioni analizzati è stata rilevata tale ammina a valori sensibili.

Identificazione di specie

I due pesci analizzati sono risultati conformi per ciò che riguardava la specie riportata in etichetta, ovvero si trattava di un esemplare di rombo chiodato (*Psetta maxima*) e di uno di palamita (*Sarda sarda*).

Tabella 1. Conteggio sommatorio della distribuzione dei microvacuoli e macrovacuoli nei preparati istologici esaminati.

	Microvacuoli		Macrovacuoli	
Grading di distribuzione (h)	12	24	12	24
Assenti	0	0	0	2
Rari-focali	2	4	4	7
Sparsi-multifocali	17	21	22	13
Diffusi	17	11	10	14
Totale	36	36	36	36

Tabella 2. Risultati delle analisi microbiologiche dei campioni freschi e congelati.

Specie	CMT 30°C (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	Salmonella	Stafilococchi (UFC/g)	Vibrio patogeni
Campioni freschi					
Salmone	490.000	<10	Neg. in 25 g	<100	Neg. in 25 g
Palamita	9.000	<10	Neg. in 25 g	<100	Neg. in 25 g
Salmone	620.000	<10	Neg. in 25 g	<100	Neg. in 25 g
Tonno alalunga	17.000	<10	Neg. in 25 g	<100	Neg. in 25 g
Tonnetto	12.000	<10	Neg. in 25 g	<100	Neg. in 25 g
Palamita	<4000	<10	Neg. in 25 g	<100	Neg. in 25 g
Tonno alalunga	.*	.*	.*	.*	.*
Palamita	.*	.*	.*	.*	.*
Palamita	120.000	<10	Neg. in 25 g	<100	Neg. in 25 g
Rombo	250.000	<10	Neg. in 25 g	<400	Neg. in 25 g
Campioni congelati					
Salmone	150.000	<10	Neg. in 25 g	<100	Neg. in 25 g
Palamita	16.000	<10	Neg. in 25 g	<100	Neg. in 25 g
Salmone	71.000	<10	Neg. in 25 g	<100	Neg. in 25 g
Tonno alalunga	<4.000	<10	Neg. in 25 g	<100	Neg. in 25 g
Tonnetto	62.000	<10	Neg. in 25 g	<100	Neg. in 25 g
Palamita	13.000	<10	Neg. in 25 g	<100	Neg. in 25 g
Tonno alalunga	.*	.*	.*	.*	.*
Palamita	.*	.*	.*	.*	.*
Palamita	18.000	<10	Neg. in 25 g	<100	Neg. in 25 g
Rombo	13.000	<10	Neg. in 25 g	<100	Neg. in 25 g

CMT 30, carica mesofila totale a 30°C; UFC, unità formanti colonie; *E. coli*, *Escherichia coli*; neg., negativo. *Campioni non esaminati a causa del prelievo di matrice insufficiente.

Discussione

Questo studio è nato dall'esigenza di creare una rete di collaborazione multidisciplinare che potesse affrontare in maniera rigorosa le tematiche sanitarie relative ai prodotti ittici. Si è infatti cercato di toccare gli aspetti più salienti delle problematiche sanitarie relative a tali prodotti, quali le frodi commerciali più comuni (dichiarazione mendace di freschezza e sostituzione di specie), la prevenzione dell'esposizione del consumatore al rischio *Anisakis* nel pesce crudo, la presenza di mercurio nei pesci carnivori, il problema dei Norovirus – spesso trascurato – e, non ultimo, i controlli sull'istamina che può a sua volta creare gravi danni alla salute del consumatore, con la ben nota sindrome sgombroide. Non abbiamo ovviamente trascurato i parametri di sicurezza alimentare, con la ricerca di germi patogeni, e gli indicatori d'igiene di processo e di deteriorabilità, mediante il conteggio di *E. coli* e della CMT.

La maggior parte dei campioni è rappresentata da pesci a carne rossa di grosse dimensioni, poiché, nel caso specifico del ristorante, questi vengono preferiti nelle preparazioni alimentari crude della cucina etnica orientale.

Si potranno implementare in futuro i campioni di pesce a carne bianca per analizzare anche le eventuali problematiche a carico di questa categoria.

I risultati ottenuti, se da un lato sono confortanti, dall'altro sollevano alcune problematiche su tali prodotti alimentari.

Il numero di campioni al momento limitato non permette di effettuare considerazioni con valenza statistica significativa, ma è importante notare come, pur trattandosi di una realtà virtuosa con fornitori scelti, la dichiarazione di freschezza del pesce non sia stata confermata

in un caso. È infatti pratica comune prolungare la vita commerciale dei pesci, soprattutto quelli che richiedono lunghi periodi di trasporto dalla zona di pesca. Pertanto, si presume che sia una problematica che affligge maggiormente i pesci pescati rispetto a quelli allevati. Nel nostro caso i pesci erano, in effetti, pescati.

Analizzando nel dettaglio la presenza e la distribuzione dei microvacuoli, si può dire che essi sono presenti in tutti i preparati istologici ed appaiono parimenti diffusi e sparsi dopo congelamento di 12 h a -20°C. Invece, dopo 24 h di congelamento a -20°C sembra che prevalga il quadro multifocale rispetto al diffuso. I casi di distribuzione focale sono assai esigui, anche se il doppio nei preparati istologici di campioni congelati per 24 h. Per quanto concerne i macrovacuoli, essi appaiono prevalentemente sparsi a 12 h e diffusi dopo 24 h di congelamento. Il quadro focale è più rappresentato per questa tipologia di vacuoli, con 7 quadri focali nei campioni sottoposti a 24 h di congelamento. L'assenza di macrovacuoli in due sezioni istologiche congelate per 24 h – nei quali erano comunque presenti microvacuoli – dovrà essere approfondita ulteriormente, anche se il caso sarebbe stato comunque classificato come congelato per la presenza dei microvacuoli stessi.

Conclusioni

In sintesi, si può ipotizzare che i microvacuoli, dapprima diffusi a 12 h, diventino sparsi allorché il congelamento prosegue, probabilmente perché, almeno in parte, si potrebbero modificare o unire tra loro formando macrovacuoli. Ciò verrebbe confermato dal fatto che, invece, i macrovacuoli sono prevalentemente diffusi a 24 h, mentre sono sparsi a 12 h di congelamento.

L'analisi statistica effettuata sulla distribuzione delle lesioni istologiche dopo 12 e 24 h di abbattimento termico ha permesso di osservare una differenza al limite della significatività statistica ($P=0,05$) tra i due tipi di congelamento.

Ulteriori indagini consentiranno di arricchire i risultati finora ottenuti in termini di livello di probabilità con cui queste potranno essere sostenute e le eventuali differenze emerse considerate statisticamente significative. Ciò verrà eseguito per valutare se il metodo istologico sia in grado di verificare se l'abbattimento termico imposto dalla legislazione vigente per il prodotto da consumarsi crudo venga effettuato per i tempi prescritti.

Per quanto riguarda i dati microbiologici, si può affermare che non siano stati riscontrati particolari degni di nota, la qual cosa in effetti non stupisce poiché si tratta di un esercizio

commerciale molto rigoroso che ha partecipato volontariamente a questo progetto. Inoltre, è un'attività che ha tendenzialmente una clientela numerosa e che fornisce servizio sia a pranzo che a cena, per cui il pesce non sosta mai a lungo nei banchi frigo o sui banchi di vendita per il sistema accoppiato di vendita e ristorazione. Non si è inoltre rilevata la presenza di Norovirus; si noti che la maggior parte dei campionamenti sono avvenuti con temperature miti o calde, mentre il picco della malattia si raggiunge in inverno (Dancer *et al.*, 2010). L'assenza di tale virus denota inoltre le corrette pratiche igieniche messe in atto dagli operatori della pescheria.

Le analisi chimiche sono state favorevoli per quanto riguarda la rilevazione dell'istamina, ricercata in specie più soggette a questa problematica. Essa deriva dall'istidina libera, presente in maggiore quantità nella muscolatura di alcune specie ittiche a carne rossa, a livello inter- ed intracellulare, oltre che nel sangue. Le famiglie di pesci più a rischio sono: Scombridae (tonno, sgombro) Clupeidae (sardina, aringa, spratto, alaccia, cheppia), e Engraulidae (acciuga). I risultati sono coerenti con le modalità di conservazione ed il breve periodo commerciale delle specie target analizzate (Visciano *et al.*, 2012). È invece importante notare che i livelli di mercurio in un campione di tonnetto alletterato erano tre volte più alti della norma. I pesci sono spesso degli accumulatori di mercurio (Storelli *et al.*, 2012), che è presente in maggior quantità in forma organica. In particolar modo, i pesci carnivori, tra i quali i tonni, sono maggiormente toccati da questa problematica a causa delle loro abitudini alimentari.

L'identificazione di specie effettuata su due campioni dubbi confermava le specie dichiarate. Si noti che si trattava di pesci già sfilettati. Ciò rispecchia una realtà commerciale che seleziona accuratamente i fornitori.

Poiché il pesce è un alimento al quale sono riconosciute una lunga serie di proprietà nutritive, è necessario tutelararlo, ma anche conoscerne le eventuali problematiche connesse al consumo non più sporadico a causa delle nuove mode alimentari.

Bibliografia

- Ayala MD, Lopez Albors O, Blanco A, Garcia Alcázar A, Abellán E, Ramirez Zarzosa G, Gil F, 2005. Structural and ultrastructural changes on muscle tissue of sea bass, *Dicentrarchus Labrax* L., after cooking and freezing. *Aquaculture* 250:215-31.
- Barlett SE, Davidson WS, 1992. FINS (forensically informative nucleotide sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Biotechni-*

Tabella 3. Quantificazione del mercurio totale nei campioni analizzati.

Specie	Mercurio (mg/kg)
Salmone	nq
Palamita	0,58
Salmone	-*
Tonno alalunga	0,89
Tonnetto alletterato	2,7**
Palamita	0,28
Tonno alalunga	0,31
Palamita	0,33
Palamita	0,85
Rombo	nq

nq, non quantificabile (<0,10 mg/kg). *Campione non esaminato a causa del prelievo di matrice insufficiente; **risultato non conforme, superiore ai limiti previsti dalla legge.

- ques 12:408-11.
- Bozzetta E, Pezzolato M, Cencetti E, Varello K, Abramo F, Mutinelli F, Ingravalle F, Teneggi E, 2012. Histology as a valid and reliable tool to differentiate fresh from frozen-thawed fish. *J Food Protect* 75:1536-41.
- Commissione Europea, 2000. Regolamento del Consiglio del 17 dicembre 1999 relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura, 104/2000/CE. In: *Gazzetta Ufficiale*, L 17, 21/01/2000.
- Commissione Europea, 2001. Regolamento della Commissione del 22 ottobre 2001 che stabilisce le modalità d'applicazione del regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio per quanto concerne l'informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura, 2065/2001/CE. In: *Gazzetta Ufficiale*, L 278, 23/10/2001.
- Commissione Europea, 2004. Regolamento del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, 853/2004/CE. In: *Gazzetta Ufficiale*, L 139, 30/04/2004.
- Commissione Europea, 2011a. Regolamento di esecuzione della Commissione dell'8 aprile 2011 recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 1224/2009 del Consiglio che istituisce un regime di controllo comunitario per garantire il rispetto delle norme della politica comune della pesca, 404/2011/UE. In: *Gazzetta Ufficiale*, L 112, 30/04/2011.
- Commissione Europea, 2011b. Regolamento della Commissione dell'8 dicembre 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, 1276/2011/UE. In: *Gazzetta Ufficiale*, L 327, 09/12/2011.
- Dancer D, Rangdale RE, Lowther JA, Lees DN, 2010. Human norovirus RNA persists in seawater under simulated winter conditions but does not bioaccumulate efficiently in Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*). *J Food Protect* 73:2123-7.
- ISO, 2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of b-glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part 2: colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl b-Dglucuronide. Norma ISO 16649-2:2001. Organizzazione internazionale per la normazione ed., Ginevra, Svizzera.
- ISO, 2003a. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species. Part 2: technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium amendment 1: inclusion of precision data. Norma ISO 6888-2:1999/Amd 1:2003. Organizzazione internazionale per la normazione ed., Ginevra, Svizzera.
- ISO, 2003b. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Colony-count technique at 30°C. Norma ISO 4833:2003. Organizzazione internazionale per la normazione ed., Ginevra, Svizzera.
- ISO, 2004. Technical corrigendum 1, 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Norma ISO 6579:2002/Corr.1:2004. Organizzazione internazionale per la normazione ed., Ginevra, Svizzera.
- ISO, 2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance for microbiological examinations. Norma ISO/TS 7218:2007. Organizzazione internazionale per la normazione ed., Ginevra, Svizzera.
- Manzoni P, Tepedino V, 2008. Grande enciclopedia illustrata dei pesci. 1a ed. Eurofishmarket ed., Trebbio di Reno, Italia.
- Pavlov A, Dimitrov D, Penchev G, Georgiev L, 2008. Structural changes in common carp (*Cyprinus carpio L.*) fish meat during freezing. *BJVM* 11:131-6.
- Storelli MM, Normanno G, Barone G, Dambrosio A, Errico L, Garofalo R, Giacomini-Stuffer R, 2012. Toxic metals (Hg, Cd, and Pb) in fishery products imported into Italy: suitability for human consumption. *J Food Protect* 75:189-94.
- Visciano P, Schirone M, Tofalo R, Suzzi G, 2012. Biogenic amines in raw and processed seafood. *Front Microbiol* 3:188.