

LA SICUREZZA IGIENICO SANITARIA DELLE PRODUZIONI ITALIANE

LINEE GUIDA PER LA GESTIONE DEL PERICOLO ISTAMINA NELLE PRODUZIONI ITTICHE ESSICcate LOMBARDE

1 Premessa

L'introduzione del Reg. CE 178/2002, seguito dall'emanazione del "Pacchetto Igiene" e del Reg. CE 2073/2005, ha definito responsabilità molto precise in regime di Sicurezza Alimentare, investendo l'operatore del settore alimentare (OSA) dell'obbligo di garantire, su base scientifica, la sicurezza dei prodotti trasformati e commercializzati.

In ambito comunitario la Sicurezza Alimentare deve essere garantita attraverso misure di prevenzione che permettano di mantenere sotto controllo tutte le fasi del processo di trasformazione e distribuzione degli alimenti, sino alla bocca del consumatore attraverso l'applicazione di procedure basate sul modello H.A.C.C.P..

Diviene pertanto prioritario garantire il raggiungimento di tali obiettivi, in primo luogo per tutelare la sicurezza del consumatore, ed in secondo luogo per rispettare i limiti dei Regolamenti Comunitari 8Reg. CE 2073/2005 e s.m.i.), potendo dimostrare scientificamente l'elevato livello igienico sanitario dei prodotti trasformati.

Gli obiettivi devono essere raggiunti attraverso l'analisi del processo di produzione che permetta di identificare correttamente i pericoli, in particolare di natura microbiologica e chimica, che devono essere gestiti affinché non rappresentino un rischio per il consumatore finale; all'analisi del processo produttivo deve seguire la dimostrazione scientifica in grado di documentare oggettivamente la capacità del processo produttivo di poter eliminare o ridurre ad un livello accettabile i pericoli e quindi, la creazione di una banca dati, consultabile in qualsiasi momento ed aggiornata in tempo reale, che consenta di dimostrare il rispetto dei requisiti richiesti in ogni fase del processo di distribuzione indipendentemente dall'esito di prove analitiche spesso insufficienti a definire un adeguato livello di sicurezza igienico sanitaria.

Obiettivo del presente volume, redatto in collaborazione tra Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Direzione Generale Welfare e i Dipartimenti Veterinari e Sicurezza Alimenti di Origine Animale della Lombardia, è quindi quello di racchiudere in un unico documento le evidenze scientifiche disponibili finalizzate a validare il processo di produzione delle produzioni ittiche essiccate lombarde attestandone i requisiti di sicurezza igienico sanitaria con un riferimento specifico alla gestione del pericolo Istamina.

2 Riassunto

I problemi igienico-sanitari che possono interessare il prodotto ittico sono la contaminazione in natura dei pesci che compongono il pescato e l'insorgenza di batteriosi e micosi durante le fasi di lavorazione/trasformazione. Il controllo svolto lungo tutta la filiera produttiva costituisce l'unica garanzia per il consumatore intermedio e finale circa la sicurezza igienico-sanitaria dei prodotti ittici, requisito fondamentale della loro qualità.

La sardina del lago d'Iseo è un agone (*Alosa fallax lacustris*), ma deve il nome alla sua forma, simile a quella del pesce marino. Dopo 48 ore di riposo sotto sale, le sardine sono lasciate a essiccare per circa un mese in luoghi ombreggiati e ventilati. Dopo l'essiccazione sono disposte in contenitori, pressate per far sgrondare il grasso e ricoperte di olio di oliva. Restano in barattolo almeno quattro mesi e si consumano appena scottate su una piastra e accompagnate dalla polenta.

L'agone destinato alla produzione dei missoltini nel lago di Como si pesca nella parte più a Nord del lago, centrale rispetto alle rive perché preferisce le acque più fresche e profonde. Una volta squamati ed eviscerati i pesci vengono posti sotto sale per due-tre giorni, poi lavati accuratamente e appesi ad asciugare al sole per una decina di giorni. Si procede adagiando gli agoni in appositi contenitori metallici, tolle, e ponendoli a strati alterni intervallati con foglie di alloro.

Il pesce ed i prodotti ittici sono coperti dalle normative sull'igiene alimentare, che prevedono disposizioni per la loro produzione e manipolazione. Tali prodotti alimentari devono soddisfare i requisiti di igiene pertinenti e provenire da stabilimenti registrati o approvati ai sensi dei regolamenti sull'igiene; oltre ai requisiti generali in materia di igiene di cui ai regolamenti (CE) n. 852/2004 e (CE) n. 854/2004 e alle loro modifiche, specifici requisiti sono riportati nel regolamento (CE) n. 853/2004 (Sezione VIII dell'allegato III) e del regolamento (CE) n. 2073/2005 (capitolo 1 dell'allegato I).

L'articolo 4 del regolamento (CE) n. 852/2004 prescrive che gli OSA rispettino i limiti microbiologici per i prodotti alimentari, il che richiede agli OSA di ottenere e analizzare campioni, confrontare i risultati con i valori fissati per i criteri e attuare azioni correttive se necessario. Il capitolo 1 dell'allegato I del regolamento (CE) n. 2073/2005 (nonché le sue modifiche, come il regolamento (CE) n. 1019/20139) stabilisce i criteri di sicurezza alimentare e i criteri di igiene del processo.

I criteri di sicurezza alimentare sono stabiliti per l'istamina in due diversi tipi di prodotti della pesca immessi sul mercato durante la loro durata di conservazione.

L'ammina biogenica più importante nei pesci è l'istamina, in quanto è il pericolo più frequentemente implicato in focolai associati al pesce e ai prodotti della pesca (7; 9). L'istamina è responsabile di un avvelenamento da allergia di tipo alimentare associato al consumo di pesce, principalmente sgombroidi come il tonno e lo sgombro. Tuttavia, anche specie non sgombroide come sardine, acciughe, aringa, pesce azzurro, salmone e pesce spada sono state coinvolte in epidemie.

Il controllo della catena del freddo è la principale strategia di gestione del rischio utilizzata per gestire il rischio di produzione di istamina nei pesci sgombroidi; inoltre, una gestione efficiente e delicata dei pesci post mortem è una buona strategia per ridurre al minimo il danno tissutale e la conseguente presenza di istidina extracellulare.

Va sottolineato che i dati provenienti da focolai e studi individuali mostrano una grande variazione nelle concentrazioni di istamina che porta a effetti negativi sul consumatore. Le variazioni di sensibilità possono anche essere il risultato di: interazione sinergica con altre ammine biogeniche come tiramina, cadaverina e putrescina; prodotti chimici non identificati nel pesce; componenti dietetici come l'alcol; o l'uso da parte del consumatore di farmaci inibitori delle monoaminossidasi (15).

La temperatura di conservazione deve essere sufficientemente bassa da inibire la crescita di batteri, come *M. psychrotolerans* e *P. phosphoreum*, che sono in grado di produrre istamina in prodotti della pesca a temperature di refrigerazione.

Gli agenti patogeni associati ai prodotti della pesca, identificati nella sezione precedente, in grado di crescere a temperature refrigerate, sono stati inclusi nelle attività di modellizzazione, utilizzando software di modellazione predittiva per prevedere l'effetto della temperatura e del tempo di conservazione sulla crescita di patogeni quali *M. psychrotolerans* come produttore di istamina.

Per prevedere l'effetto della temperatura sulla crescita e la formazione di istamina da parte di *M. psychrotolerans* in prodotti ittici confezionati a livello di vendita al dettaglio, è stato utilizzato il Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP TM) v. 4.0 (www.fssp.dtu.dk).

Questo modello per *M. psychrotolerans* include l'effetto di quattro parametri ambientali (temperatura, atmosfera (CO₂), attività dell'acqua (sale in fase acquosa) e pH sulla crescita e sulla formazione di istamina. FSSP TM può essere usato per valutare come cambiamenti nelle condizioni di conservazione (per esempio la temperatura di conservazione del freddo) o le caratteristiche del prodotto (per esempio concentrazione di sale) influenzino la crescita e la formazione di istamina da parte di *M. psychrotolerans*.

Il controllo della temperatura di stoccaggio è uno degli approcci legislativi per garantire che i prodotti alimentari non contengano una concentrazione inaccettabile di pericoli microbici al momento del consumo. Tuttavia, questo requisito esiste in parallelo con vari altri obblighi normativi, come il requisito per gli operatori di stabilire la durabilità del prodotto, l'obbligo di identificare i pericoli e gestire i rischi risultanti all'interno del sistema di gestione della sicurezza alimentare attraverso i criteri microbiologici richiesti.

Sulla base di quanto sopra, i modelli predittivi disponibili per la formazione di istamina possono essere utilizzati dagli OSA per regolare la durabilità del prodotto della pesca (massima shelf-life) e / o modificare l'atmosfera di imballaggio del prodotto in base alla temperatura di vendita al fine di garantire la conformità con la sicurezza del prodotto riferito al criterio istamina.

3 Summary

The health and hygiene problems that may affect the fish products are the contamination in nature of the fish that make up the fish and the onset of bacterial and mycosis during the processing / transformation phases. The control carried out along the entire production chain is the only guarantee for the intermediate and final consumer about the hygienic - safety of fish products, a fundamental requirement of their quality. In order to protect the consumer, the fish products of the fish are subject to the control of the Competent Health Authorities and operators at different levels of the supply chain.

The sardine of Iseo Lake is an agone (*Alosa fallax lacustris*), but owes its name to its shape, similar to that of marine fish. After 48 hours of rest in salt, the sardines are left to dry for about a month in shady and ventilated places. After drying they are placed in containers, pressed to drain the fat and covered with olive oil. They remain in the jar for at least four months and are consumed just blanched on a plate and accompanied by polenta.

The agone intended for the production of missoltini in Como Lake is fishing in the northern part of the lake, central to the banks because it prefers cooler and deeper waters. Once scaled and gutted the fish are placed in salt for two or three days, then washed thoroughly and hung to dry in the sun for about ten days. The agons are placed in special metal containers, "tolle", and placed in alternating layers interspersed with bay leaves.

Fish and fish products are covered by the rules on food hygiene, which include provisions for their production and handling. These food products must meet the relevant hygiene requirements and come from establishments registered or approved in accordance with the hygiene regulations; in addition to the general hygiene requirements set out in Regulations (EC) no. 852/2004 and (CE) n. 854/2004 and to their modifications, specific requirements are reported in the regulation (CE) n. 853/2004 (Section VIII of Annex III) and of Regulation (EC) no. 2073/2005 (Chapter 1 of Annex I).

Article 4 of Regulation (EC) No 852/2004 prescribes that the FBO respect the microbiological limits for food products, which requires the FBO to obtain and analyze samples, compare the results with the values set for the criteria and implement corrective actions if necessary. Chapter 1 of Annex I to Regulation (EC) No 2073/2005 (as well as its amendments, such as Regulation (EC) No. 1019/2013) establishes food safety criteria and process hygiene criteria.

Food safety criteria are established for histamine in two different types of fishery products placed on the market during their shelf life.

Other biogenic amines (tyramine, putrescine, cadaverine, etc.) produced by the decarboxylation of amino acids during bacterial growth of fish may enhance the effect of histamine (4), but the contribution of these biogenic amines to fish poisoning is not clear.

The most important biogenic amine in fish is histamine, as it is the most frequently implicated danger in outbreaks associated with fish and fishery products (7; 9). Histamine is responsible for food-related allergy

poisoning associated with fish consumption, such as tuna and mackerel. However, even non-mackerel species such as sardines, anchovies, herring, bluefish, salmon and swordfish have been involved in epidemics.

Cold chain control is the main risk management strategy used to manage the risk of histamine production in the mackerel fish; moreover, efficient and delicate management of post mortem fish is a good strategy to minimize tissue damage and consequent extracellular histidine.

It should be emphasized that data from outbreaks and individual studies show a large variation in histamine concentrations that leads to negative effects on the consumer. Sensitivity variations can also be the result of: synergistic interaction with other biogenic amines such as tyramine, cadaverine and putrescine; unidentified chemical products in fish; dietary components such as alcohol; or the use by the consumer of monoamine oxidase inhibitor drugs (15).

The storage temperature must be low enough to inhibit the growth of bacteria, such as *M. psychrotolerans* and *P. phosphoreum*, which are able to produce histamine in fishery products at refrigeration temperatures. Pathogens associated with fishery products, identified in the previous section, able to grow at refrigerated temperatures, were included in modeling activities, using predictive modeling software to predict the effect of temperature and conservation time on the growth of pathogens such as *M. psychrotolerans* as a manufacturer of histamine.

To predict the effect of temperature on the growth and formation of histamine by *M. psychrotolerans* in fish products packaged at retail level, the Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP TM) was used. 4.0 (www.fssp.dtu.dk).

This model for *M. psychrotolerans* includes the effect of four environmental parameters (temperature, atmosphere (CO₂), water activity (salt in aqueous phase) and pH) on the growth and formation of histamine. FSSP TM can be used to evaluate how changes in storage conditions (eg cold storage temperature) or product characteristics (eg salt concentration) affect the growth and formation of histamine by *M. psychrotolerans*.

Storage temperature control is one of the legislative approaches to ensure that food products do not contain an unacceptable concentration of microbial hazards at the time of consumption. However, this requirement exists in parallel with various other regulatory obligations, such as the requirement for operators to establish the durability of the product, the obligation to identify hazards and manage the risks arising within the food safety management system through the microbiological criteria required.

Based on the above, the predictive models available for the formation of histamine can be used by the OSAs to regulate the durability of the fishery product (maximum shelf-life) and / or modify the packaging atmosphere of the product based on the temperature of sale in order to ensure compliance with the product safety referred to the histamine criterion.

4 Le produzioni ittiche essiccate della Regione Lombardia

La pesca di professione sui laghi è una risorsa per il territorio lombardo.

Le indicazioni che provengono dalle statistiche del pescato professionale lasciano intendere che per alcuni laghi lombardi il numero di pescatori sia arrivato al massimo sostenibile per poter ragionevolmente godere di un reddito da pesca sufficiente e dignitoso. (1)

Pertanto, l'incentivazione ad intraprendere questo mestiere dovrà necessariamente tenere conto del contesto territoriale, ambientale ed economico specifico dell'ambiente lacustre designato. Occorre incentivare i pescatori attuali o futuri, mediante opportuna formazione, a valorizzare meglio il prodotto del loro lavoro. I pescatori di mestiere dovranno essere sempre più formati in un contesto multidisciplinare che spazia dalle questioni ambientali, sanitarie, economiche. L'attività di formazione verso nuovi addetti ai lavori del settore della pesca professionale dovrà perseguire i seguenti obiettivi:

- fornire al pescatore nozioni relative alla valorizzazione del prodotto, agli aspetti igienico sanitari, ai prezzi e alla gestione della risorsa.
- diffondere i principi della pesca responsabile ed ecosostenibile.

I problemi igienico-sanitari che possono interessare il prodotto ittico sono la contaminazione in natura dei pesci che compongono il pescato e l'insorgenza di batteriosi e micosi durante le fasi di lavorazione/trasformazione. Il controllo svolto lungo tutta la filiera produttiva costituisce l'unica garanzia per il consumatore intermedio e finale circa la sicurezza igienico-sanitaria dei prodotti ittici, requisito fondamentale della loro qualità. Al fine di tutelare il consumatore, i prodotti ittici del pescato sono sottoposti al controllo delle Autorità Sanitarie Competenti e degli operatori a più livelli della filiera. (1)

Nei seguenti capitoli sono presi in considerazione due tipologie di prodotti ottenuti a partire dalla medesima specie ittica, l'agone (*Alosa fallax lacustris*): la sardina essicata ed il missoltino.

4.1 La sardina essicata tradizionale del lago di Iseo

La sardina deve il suo nome alla forma, simile a quella del pesce marino. Dopo 48 ore di riposo sotto sale, le sardine sono lasciate a essicare per circa un mese in luoghi ombreggiati e ventilati. Una volta essicate sono disposte in contenitori, pressate per far sgrondare il grasso e ricoperte di olio di oliva. Restano in barattolo almeno quattro mesi e si consumano appena scottate su una piastra e accompagnate dalla polenta.

Questo metodo di conservazione è stato messo a punto nel tempo dai pescatori del lago d'Iseo per conservare a lungo le sardine che, in alcuni periodi dell'anno, erano pescate in grandi quantità. Secondo la tradizione orale, questa tecnica risalirebbe ad almeno mille anni fa, quando i pescatori della piscaria di Iseo ogni anno dovevano consegnare una precisa quantità di pesce essicato al monastero di Santa Giulia di Brescia. Oggi sul lago rimangono pochi pescatori professionisti. L'eccessivo prelievo di pesce e la mancanza di un'attività di ripopolamento nel lago d'Iseo fanno sì che il pescato locale sia in costante

diminuzione, tanto che si è diffusa una produzione di sardine essiccate fatta con pesce proveniente da altri laghi. (17).

Il dettaglio del processo di produzione è reperibile anche sul sito www.ars-alimentaria.it



4.2 Il missoltino del lago di Como essiccato al sole

In questa preparazione l'agone si pesca nella parte più a Nord del lago, in posizione centrale rispetto alle rive perché preferisce le acque più fresche e profonde, calando reti volanti lunghe anche duecento metri che si estendono a decine di metri di profondità e in cui si impigliano gli agoni di passaggio. Una volta squamati ed eviscerati i pesci vengono posti sotto sale per due-tre giorni, poi lavati accuratamente e appesi ad asciugare al sole per una decina di giorni. Si procede adagiando gli agoni in appositi contenitori metallici, tolle, e ponendoli a strati alterni intervallati con foglie di alloro. Una volta le tolle metalliche erano barili in legno chiamati missolte, da qui il nome missoltino dato all'agone conservato al suo interno.

Oggi a pescare gli agoni sul lago sono rimasti in pochi e il pescato arriva più facilmente da altre zone di Italia e di Europa con un prezzo sicuramente più competitivo.

E ancora meno sono coloro che, oltre a pescare, tramandano l'arte di fare i missoltini essiccati naturalmente come prevede la tradizione. Una pratica lunga e laboriosa in cui si devono squamare e pulire i pesci, fare attenzione alle dosi di sale che si somministrano, appenderli uno ad uno agli essiccatoi, controllare l'evoluzione del grasso durante l'essiccazione per capire quando sono pronti per la lenta conservazione nelle tolle.

Un prodotto di notevole interesse e dalle indubbie proprietà nutritive e organolettiche che può essere consumato semplicemente cotto alla griglia e accompagnato da polenta oppure fatto rinvenire e poi cucinato. (18)

Il dettaglio del processo di produzione è reperibile anche sul sito www.ars-alimentaria.it



5 Istamina associata al consumo di produzioni ittiche

5.1 Introduzione e requisiti normativi

Il pesce ed i prodotti ittici sono coperti dalle normative sull'igiene alimentare, che prevedono disposizioni per la loro produzione e manipolazione. Tali prodotti alimentari devono soddisfare i requisiti di igiene pertinenti e provenire da stabilimenti registrati o approvati ai sensi dei regolamenti sull'igiene; **oltre ai requisiti generali in materia di igiene di cui ai regolamenti (CE) n. 852/2004 e (CE) n. 854/2004 e alle loro modifiche, specifici requisiti sono riportati nel regolamento (CE) n. 853/2004 (Sezione VIII dell'allegato III) e del regolamento (CE) n. 2073/2005 (capitolo 1 dell'allegato I).**

Il regolamento (CE) n. 852/2004 sull'igiene dei prodotti alimentari stabilisce requisiti generali in materia di igiene alimentare e un quadro comune per garantire la sicurezza degli alimenti. Comprende gli obblighi generali dell'operatore del settore alimentare (OSA) in materia di igiene alimentare, i requisiti per le procedure di gestione della sicurezza alimentare basate sull'analisi dei rischi e dei punti critici (HACCP), i requisiti di igiene per strutture, attrezzature e processi, formazione del personale e conformità con criteri microbiologici per i prodotti alimentari. Il regolamento (CE) n. 854/2004 stabilisce requisiti specifici per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano.

Il regolamento (CE) n. 853/2004 sull'igiene dei prodotti alimentari di origine animale stabilisce norme specifiche per gli OSA e integra il regolamento (CE) n. 852/2004 aggiungendo requisiti specifici in materia di igiene per i prodotti di origine animale come il pesce e i prodotti della pesca. I requisiti sono stabiliti per quanto riguarda la temperatura dei locali di lavorazione. Nel caso di stabilimenti che trattano prodotti della pesca, è necessario che *"quando i prodotti refrigerati e non confezionati non sono distribuiti, spediti, preparati o trasformati immediatamente dopo aver raggiunto uno stabilimento a terra, devono essere immagazzinati sotto ghiaccio in appositi impianti. Il re-icing deve essere eseguito tutte le volte che è necessario. I prodotti della pesca fresca imballati devono essere raffreddati ad una temperatura vicina a quella del ghiaccio in fusione"*.

Durante lo stoccaggio e il trasporto, i prodotti della pesca (prodotti della pesca freschi, prodotti della pesca non lavorati scongelati e prodotti cotti e refrigerati di crostacei e molluschi) devono essere mantenuti ad una temperatura prossima a quella del ghiaccio in fusione.

5.2 Criteri microbiologici

L'articolo 4 del regolamento (CE) n. 852/2004 prescrive che gli OSA rispettino i limiti microbiologici per i prodotti alimentari, il che richiede agli OSA di ottenere e analizzare campioni, confrontare i risultati con i valori fissati per i criteri e attuare azioni correttive se necessario. Il capitolo 1 dell'allegato I del regolamento (CE) n. 2073/2005 (nonché le sue modifiche, come il regolamento (CE) n. 1019/20139) stabilisce i criteri di sicurezza alimentare e i criteri di igiene del processo.

I criteri di sicurezza alimentare sono stabiliti per l'istamina in due diversi tipi di prodotti della pesca immessi sul mercato durante la loro durata di conservazione:

- **nel caso di prodotti ittici provenienti da specie ittiche associate a concentrazioni relativamente elevate di istidina** (famiglie Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryphaenidae, Pomatomidae, Scomberesocidae), il piano di campionamento comprende nove unità campionarie; In due delle unità, **la concentrazione di istamina può essere compresa tra 100 e 200 mg / kg; in nessuno può superare il limite di 200 mg / kg e la media dovrebbe essere inferiore a 100 mg / kg.**
- il secondo tipo comprende i **prodotti ittici delle stesse specie ittiche (vedi sopra) che hanno subito un trattamento di maturazione enzimatica in salamoia**; è richiesto un piano di campionamento di nove unità: in due delle unità **la concentrazione di istamina può essere compresa tra 200 e 400 mg / kg; in nessuna delle unità può essere superiore al limite di 400 mg / kg.**

Per entrambi questi tipi di prodotti, il metodo analitico specificato è la cromatografia liquida ad alta pressione (2; 3).

Tabella 1: Presenza di istamina in carne di pesce fresca, congelata o in scatola non sottoposta a processo di fermentazione (gruppo EFSA BIOHAZ, 2011a) – Fonte: EFSA Journal 2015;13(7):4162

Number of samples (n)	Percentage of non-detected (ND)	Mean	Percentile P5	Median P 50	Percentile P95	Maximum
6 545	73 %	26.8–31.2	< 0.1	< 2.5	60.5–100	8 910

Altre ammine biogeniche (tiramina, putrescina, cadaverina, ecc.) prodotte dalla decarbossilazione degli amminoacidi durante la crescita batterica dei pesci possono potenziare l'effetto dell'istamina (4), ma il contributo di queste ammine biogeniche all'avvelenamento da pesce non è chiaro. Secondo l'EFSA (gruppo EFSA BIOHAZ, 2011a), i dati dei focolai mostrano grandi variazioni nelle concentrazioni di istidina che portano a effetti negativi nel consumatore. Le variazioni di sensibilità possono anche essere il risultato dell'interazione con altre ammine biogeniche, altri costituenti della dieta come l'alcol o farmaci con inibitori della diammina ossidasi.

Il regolamento (CE) n. 2073/2005 contiene anche criteri di sicurezza alimentare per gli alimenti pronti al consumo (RTE) in grado di sostenere la crescita di *Listeria monocytogenes*. I prodotti con pH ≤ 4,4 o aw ≤ 0,92, i prodotti con pH ≤ 5,0 e aw ≤ 0,94 e i prodotti con una durata di conservazione inferiore a 5 giorni non sono ritenuti in grado di sostenere la crescita di *L. monocytogenes*. La rilevanza di questi criteri è probabilmente maggiore nel contesto dell'attuale mandato riguardante i prodotti della pesca RTE da consumare crudi.

5.3 Batteri istamino produttori

Un pericolo di origine alimentare è definito dalla Commissione del Codex Alimentarius come un "agente biologico, chimico o fisico o una proprietà del cibo con il potenziale di provocare un effetto negativo sulla

salute" (5). **I prodotti della pesca freschi sono associati a malattie di origine alimentare.** Nel 2013, ad esempio, l'8,5% delle epidemie di alimenti in Europa sono state associate a prodotti ittici e pesce, mentre i crostacei, i molluschi e i relativi prodotti hanno rappresentato il 7,3% (6). **Questo è in ampio accordo con Huss et al. (7), che ha suggerito che fino al 10% delle epidemie di origine alimentare in un dato anno sono legate al consumo di prodotti ittici.** Mentre i patogeni come *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* di tipo E, *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. e batteri e virus fecali possono contaminare il pesce, causando malattie umane (8), **la maggior parte dei focolai di origine marina sono associati con ammine biogeniche (7; 9).**

L'ammina biogenica più importante nei pesci è l'istamina, in quanto è il pericolo più frequentemente implicato in focolai associati al pesce e ai prodotti della pesca (7; 9). L'istamina è responsabile di un avvelenamento da allergia di tipo alimentare associato al consumo di pesce, principalmente sgombridi come il tonno e lo sgombro. Tuttavia, anche specie non sgombride come sardine, acciughe, aringa, pesce azzurro, salmone e pesce spada sono state coinvolte in epidemie.

I sintomi includono mal di testa, eruzione cutanea, bruciore orale, sensazione di formicolio alle dita e diarrea e di solito si verificano entro 60 minuti dall'ingestione (9). I tessuti muscolari dei pesci sgombridi sono ricchi di istidina e la sgombrotossina si forma tipicamente quando l'istidina viene convertita dall'enzima batterico istidina decarbossilasi (10).

L'istidina decarbossilasi è prodotta da una gamma di batteri tra cui *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Morganella psychrotolerans*, *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium psychrotolerans*, *Photobacterium damsela*, *Citrobacter koseri*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp. e *Enterobacter* spp. (11)

Poiché la maggior parte di questi batteri è mesofila, inizialmente si pensava che la formazione di istamina potesse essere prevenuta se i pesci fossero stati conservati a temperature di refrigerazione corrette. Tuttavia, ricerche più recenti hanno riportato *M. psychrotolerans* e *P. phosphoreum* come produttori significativi di istamina a temperature comprese tra 0 e 5 ° C (11). Dalgaard et al. (9), ad esempio, hanno riportato livelli di istamina fino a 4 490 ppm prodotti da ceppi di *P. phosphoreum* in pesci conservati a 5 °C sia in aria che in imballaggi atmosferici modificati (MAP). I focolai di intossicazione da istamina sono stati associati a pesci contenenti 750-900 ppm, 1200 ppm e 1000-1200 ppm di istamina (9). Un elenco delle combinazioni segnalate di batteri e prodotti è fornito nella Tabella 2 e le informazioni su alcuni focolai di istamina associati ai pesci sono fornite nella Tabella 3.

Tabella 2: Combinazioni di batteri e prodotti associati alla produzione di istamina – Fonte: EFSA Journal 2015;13(7):4162

Histamine-producing bacteria	Fishery product	Country	Reference
<i>Morganella morganii</i>	Salted semi-preserved anchovies (<i>Engraulis encrasicolus</i> var. <i>mediterraneus</i>)	Spain	Rodriguez-Jerez et al. (1994)
	Yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>)	India	Emborg et al. (2005)
	Tuna (<i>Thunnus obesus</i>)	Japan	Tao et al. (2009)
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Garfish fillets (<i>Belone belone belone</i>)	Denmark	Dalgaard et al. (2006)
	Yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>)	India	Emborg et al. (2005)
	Mackerel (<i>Scomber</i> or <i>Trachurus</i> spp.)	Japan	Morii and Kasama (2004)
	Tuna (<i>Thunnus obesus</i>)	Japan	Tao et al. (2009)
	Salmon (<i>Salmo salar</i>)	Norway	Emborg et al. (2002)
<i>Photobacterium damsela</i>	Jack mackerel (<i>Trachurus symmetricus</i>)	Chile	Bermejo et al. (2003)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Mahi-mahi (<i>Coryphaena hippurus</i>) and yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>)	USA	Allen et al. (2005)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Sailfish (<i>Istiophorus platypterus</i>) and milkfish (<i>Chanos chanos</i>)	Taiwan	Tsai et al. (2005)
<i>Staphylococcus kloosii</i>	Mahi-mahi (<i>Coryphaena hippurus</i>) and yellowfin tuna (<i>Thunnus albacares</i>)	USA	Allen et al. (2005)
<i>Staphylococcus xylosum</i>	Salted semi-preserved anchovies (<i>Engraulis encrasicolus</i> var. <i>mediterraneus</i>)	Spain	Rodriguez-Jerez et al. (1994)
<i>Proteus vulgaris</i>	Jack mackerel (<i>Trachurus symmetricus</i>)	Chile	Bermejo et al. (2003)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Jack mackerel (<i>Trachurus symmetricus</i>)	Chile	Bermejo et al. (2003)

Tabella 3: Focolai di ammine biogeniche associate ai pesci – Fonte: EFSA Journal 2015;13(7):4162

Pathogen	Fishery product	Country	Reference
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Dried sardine (<i>Iwashi maruboshi</i>)	Japan	Kanki et al. (2004)
Specific histamine-producing bacteria strains not reported	Frozen raw swordfish fillets (<i>Xiphias gladius</i>)	Taiwan	Chang et al. (2007)
<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Raoultella ornithinolytica</i> and <i>Morganella morganii</i>	Striped marlin (<i>Tetrapturus audax</i>)	Taiwan	Lee et al. (2013)
<i>Bacillus subtilis</i> and <i>Enterobacter aerogenes</i>	Mahi-mahi (<i>Coryphaena hippurus</i>)	Taiwan	Chen et al. (2011)
Specific histamine-producing bacteria strains not reported	Marlin fillets	Taiwan	Hwang et al. (1999)

Pertanto, mentre temperature più elevate possono aumentare la probabilità di crescita di organismi batterici in grado di produrre istidina decarbossilasi, alcuni batteri rilevanti possono anche crescere a basse temperature. Inoltre, a parte l'effetto della temperatura sulla crescita batterica e sulla produzione di enzimi, l'attività dell'enzima una volta formato è indipendente dalla temperatura.

Grandi quantità di istamina si formano, ad esempio, da *M. morganii*, anche a basse temperature (0-5 °C), a seguito di conservazione a temperature più elevate (10-25 °C), anche se la crescita batterica non si verifica a temperature inferiori a 5 °C (12). Ciò si verifica perché l'enzima istidina

decarbossilasi, generata durante lo stoccaggio a temperature elevate, rimane attivo alle basse temperature ed è responsabile della produzione di istamina a 5 °C o a temperatura inferiore. Inoltre, le ammine biogeniche sono molto stabili al calore e, una volta formate, non saranno distrutte nemmeno con un trattamento termico di sterilizzazione in autoclave (121 °C per 15-20 minuti).

Sebbene vi sia una carenza di dati sui livelli di istidina e istamina nei pesci, un'indagine sui livelli di istidina libera presenti nel pesce al dettaglio in Nuova Zelanda ha trovato livelli tra 2 000 e 10.000 mg / kg in varie specie (13). Si è concluso che molte specie hanno il potenziale per provocare intossicazione da istamina (14). Poiché tutti gli episodi di intossicazione da istamina in Nuova Zelanda nei 10 anni precedenti il 1997 hanno coinvolto pesce affumicato a caldo, lo studio è stato esteso per studiare i livelli di istamina in questi prodotti. In otto campioni, ottenuti da cinque diversi rivenditori, i livelli di istamina erano superiori a 50 mg / kg, con livelli in due di questi campioni superiori a 200 mg / kg (346,4 e 681,8 mg / kg). Inoltre, se conservati a 20 °C per 4 giorni, otto campioni su 33 hanno sviluppato livelli di istamina superiori a 50 mg / kg, con livelli su quattro dei 33 campioni superiori a 200 mg / kg (massimo 1 659,4 mg / kg).

Il controllo della catena del freddo è la principale strategia utilizzata per gestire il rischio di produzione di istamina nei pesci sgombroidi; inoltre, una gestione efficiente e delicata dei pesci post mortem è una buona strategia per ridurre al minimo il danno tissutale e la conseguente istidina extracellulare.

Va sottolineato che i dati provenienti da focolai e studi individuali mostrano una grande variazione nelle concentrazioni di istamina che porta a effetti negativi sul consumatore. Le variazioni di sensibilità possono anche essere il risultato di: interazione sinergica con altre ammine biogeniche come tiramina, cadaverina e putrescina; prodotti chimici non identificati nel pesce; componenti dietetici come l'alcol; o l'uso da parte del consumatore di farmaci inibitori delle monoaminossidasi (15).

La temperatura di conservazione deve essere sufficientemente bassa da inibire la crescita di batteri, come *M. psychrotolerans* e *P. phosphoreum*, che sono in grado di produrre istamina in prodotti della pesca a temperature di refrigerazione.

6 Documentazione scientifica a supporto della sicurezza igienico sanitaria del processo di produzione

6.1 Protocollo di valutazione igienico-sanitaria degli agoni essiccati e conservati sott'olio

Nel corso del 2009, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell' E.Romagna, in collaborazione con alcuni produttori di agoni essiccati, ha condotto un PROTOCOLLO DI VALUTAZIONE IGIENICO-SANITARIA DEGLI AGONI ESSICCATI E CONSERVATI SOTT'OLIO. Lo scopo del lavoro era approfondire le conoscenze su un particolare prodotto ittico stagionale tipico del Lago d'Iseo, l'agone (o sardina) essiccato e conservato sott'olio, per capire le eventuali problematiche igienico sanitarie connesse al suo processo produttivo e quindi gli eventuali potenziali riflessi sul consumo di tale alimento.

6.1.1 Materiali e Metodi

- Tipologia di alimento

La prova ha riguardato Agoni o sardine essiccati e conservati sott'olio (prodotto dichiarato da consumare dopo cottura alla brace).

- Campionamento ed analisi

Il lavoro ha previsto l'effettuazione di analisi microbiologiche, e chimico-fisiche su 5 lotti di Agoni o sardine essiccati e conservati sott'olio di 5 diversi produttori del Lago d'Iseo.

I prelievi sono stati effettuati da personale IZSLER in diversi momenti durante il processo produttivo e la successiva fase di conservazione del prodotto, secondo la seguente tempistica:

- Tempo 0 (pesce fresco);
- dopo salatura (a secondo dei produttori dura 2-3 giorni);
- a fine essiccazione (dura a seconda dei produttori circa 10-20 gironi);
- a fine torchiatura prima del trasferimento sott'olio (la fase dura 3-5 giorni);
- sul prodotto pronto alla commercializzazione (dopo circa 60 giorni di conservazione sott'olio);
- sul prodotto dopo circa 90 e 120 giorni dall'inizio del processo produttivo.

Le analisi previste su tutti i campioni:

- Numerazione della Carica batterica totale mesofila e psicofila
- Numerazione delle Enterobacteriaceae
- Numerazione dei Lattobacilli mesofili e dei Lattococchi
- Numerazione dei Miceti (lieviti e muffe)
- Numerazione dei Clostridi solfito riduttori
- Determinazione di pH
- Determinazione di Aw
- Ricerca di *Cl. botulinum*
- Ricerca di *Listeria* spp.
- Ricerca di Istamina tramite kit Elisa (Tecna)

La determinazione del pH è stata effettuata mediante strumento con compensazione automatica della temperatura (Hanna Instruments HI 223) mentre per il rilievo dell'attività dell'acqua (Aw) si è utilizzato l'apparecchiatura della Ditta Testo 650 con sonda fattore k (T 95).

Nel maggio 2009 sono stati campionati altri 6 lotti di Agoni essiccati pronti per la commercializzazione prodotti da uno dei 5 produttori nel quale erano stati rilevati elevati livelli di istamina (Produttore n°1)

Alla fine del 2009, dopo un sopralluogo nel sito di produzione, con l'effettuazione di tamponi ambientali, è stata ripetuta la campionatura sul prodotto dello stesso produttore su cui sono state effettuate la numerazione di Enterobatteriacee e la ricerca di Istamina.

6.1.2 Risultati

Le analisi per la ricerca di *Listeria* e di *Cl. botulinum* hanno evidenziato assenza in tutti i campioni.

Nelle figure da 1 a 8 sono riportati i grafici relativi all'andamento della Carica batterica mesofila, della carica batterica aerobia psicrofila, delle flore lattiche, del pH e dell'Acqua libera nei prodotti dei 5 produttori.

Figura 1: Andamento della CBT aerobia mesofila negli agoni essiccati e conservati sott'olio

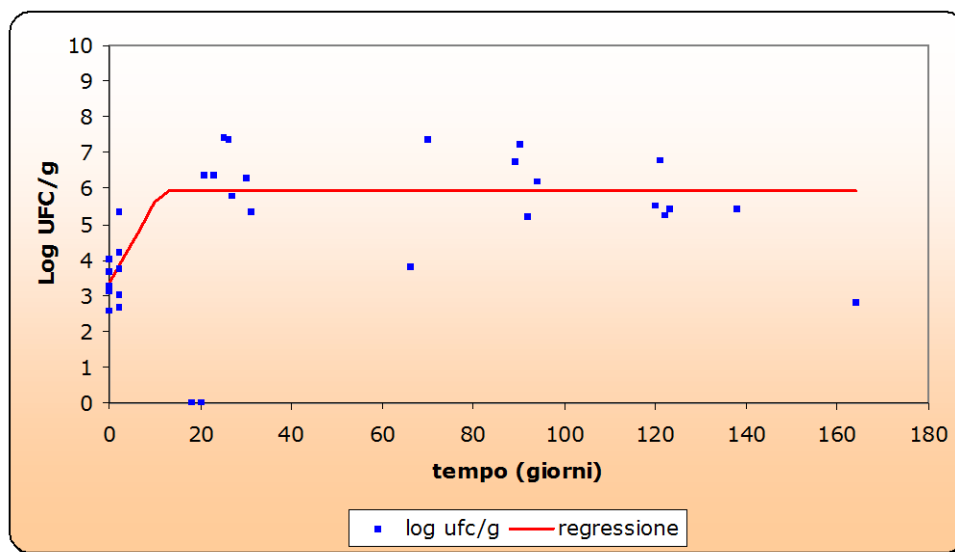


Figura 2: Andamento della CBT aerobia psicrofila negli agoni essiccati e conservati sott'olio

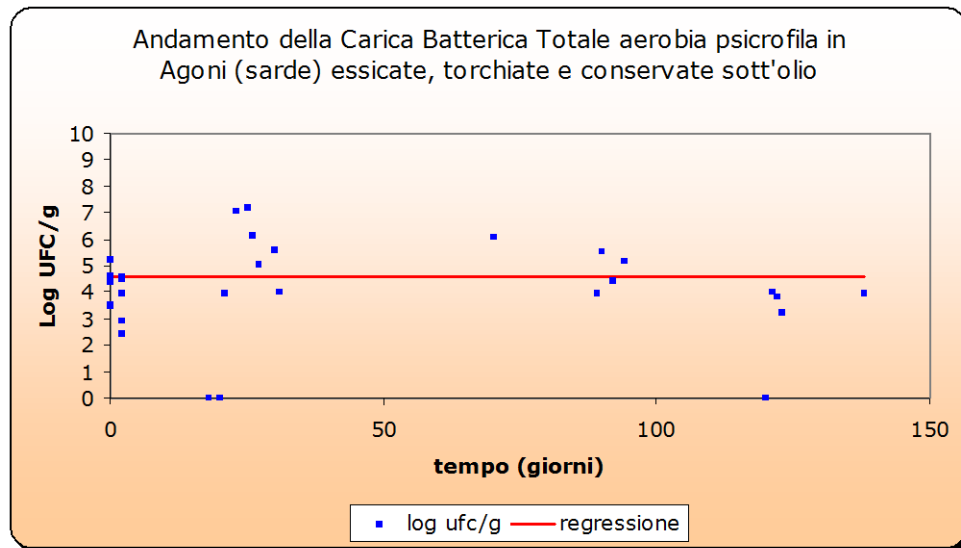


Figura 3 andamento delle flore lattiche mesofile negli agoni essiccati e conservati sott'olio

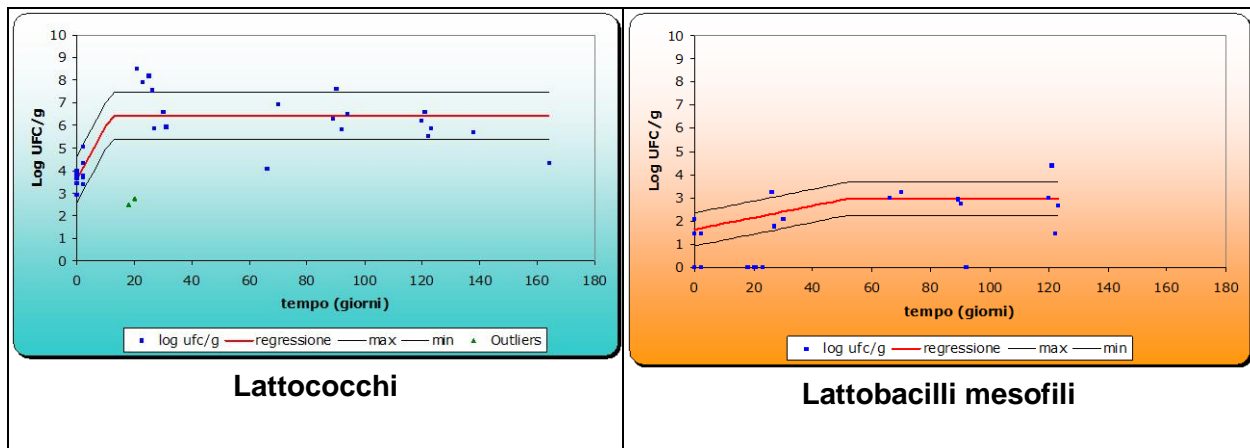


Figura 4 andamento del pH e dell'Aw negli agoni essiccati e conservati sott'olio

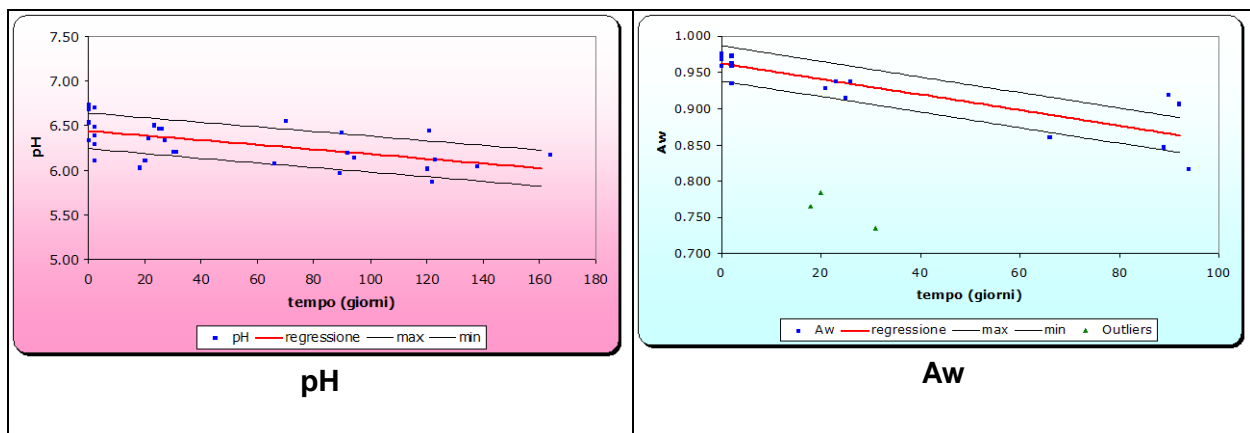


Figura 5 andamento delle Enterobatteriacee negli agoni essiccati e conservati sott'olio

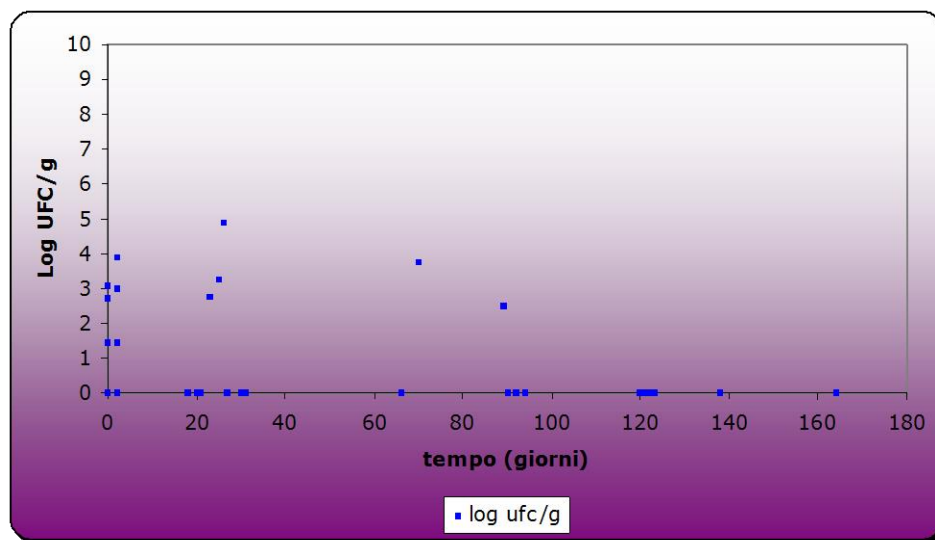


Figura 6 andamento dei Clostridi solfito riduttori negli agoni essiccati e conservati sott'olio

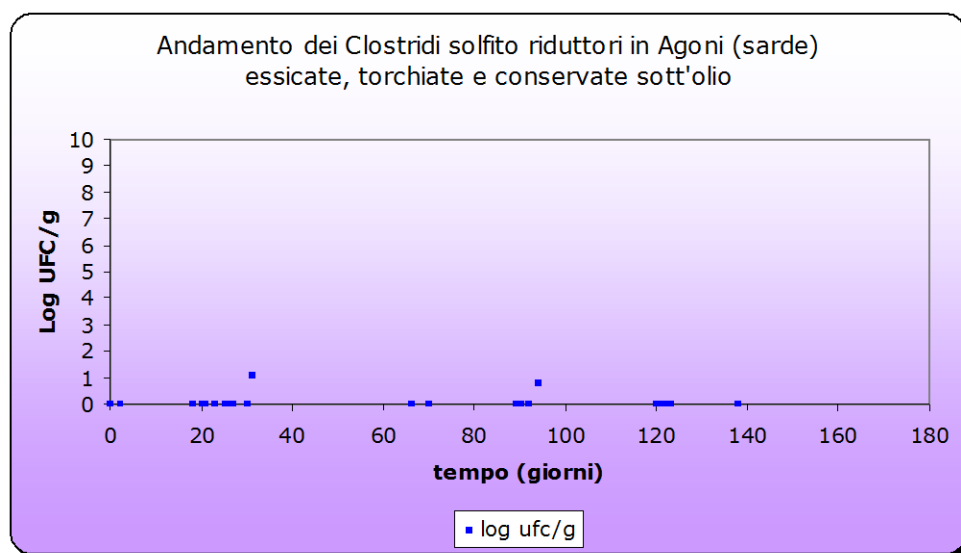


Figura 7 andamento delle muffe negli agoni essiccati e conservati sott'olio

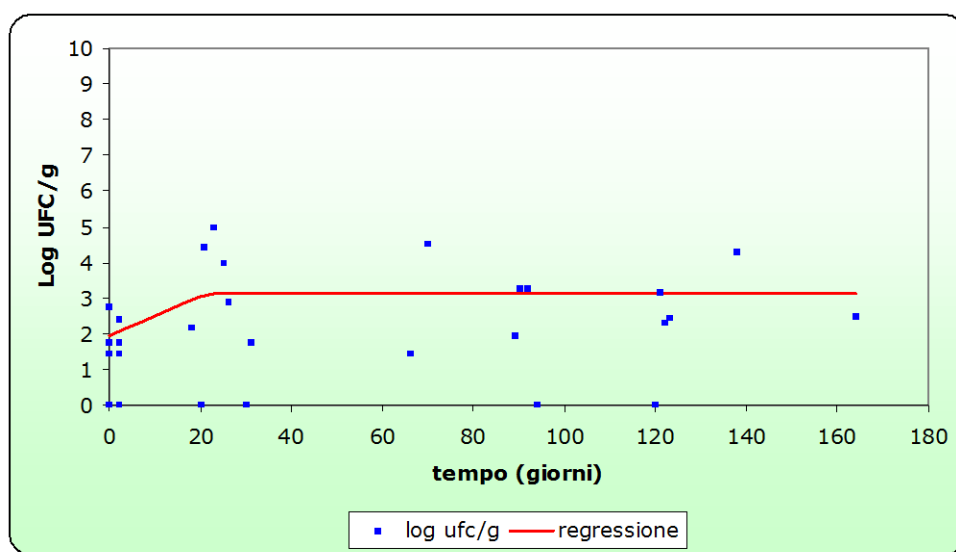
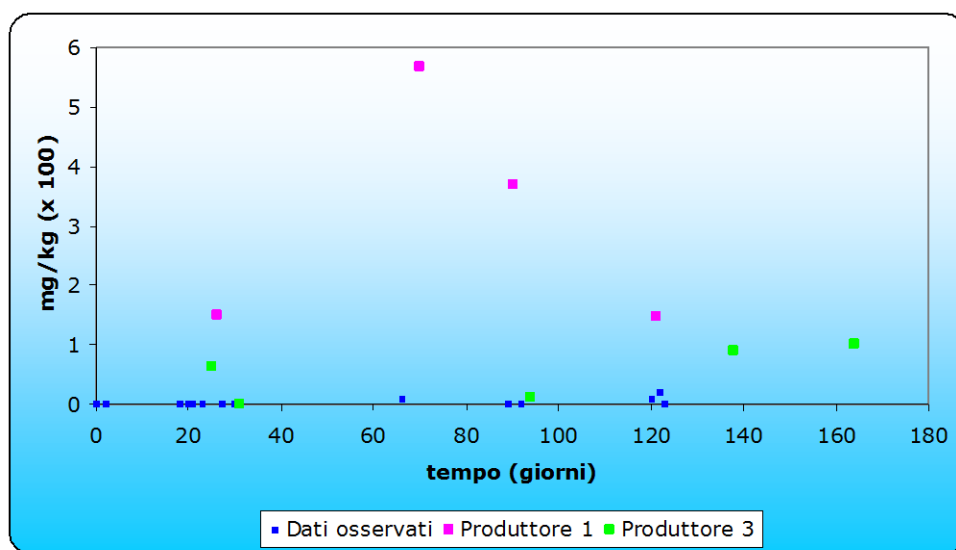


Figura 8 andamento dell'Istamina negli agoni essiccati e conservati sott'olio



Nelle successive tabelle 1 e 2 si riportano i valori di Enterobatteriacee e di istamina rilevati nei campioni del produttore 1 che ha presentato i valori di istamina superiori al limite di legge rispettivamente nel lotto di prodotto campionato ed analizzato ad inizio e a fine 2009.

Tabella 4: valori di Enterobatteriacee e Istamina negli Agoni prodotti dal produttore 1 a gennaio 2009

Giorno del prelievo	Enterobatteriacee (log ufc/g)	Istamina (mg/kg)
Tempo 0	n.r.	< 10
3gg	3.00	< 10
25 gg	4.89	150
70 gg	3.77	568
90 gg	n.r.	370
121 gg	n.r.	147

n.r. = microrganismi non rilevati

Nei 6 lotti di Agoni essiccati e conservati sott'olio prelevati a maggio 2009 presso il Produttore 1 sono stati rilevati i seguenti valori di istamina: 546, 77, 169, 233, 194, 176. mg/kg.

Tabella 5: valori di Enterobatteriacee e Istamina negli Agoni prodotti dal produttore 1 a dicembre 2009

Giorno del prelievo	Enterobatteriacee (log ufc/g)	Istamina (mg/kg)
Tempo 0	4.64	< 10
3gg	n.r.	< 10
37 gg	n.r.	< 10
150 gg	n.r.	42
205 gg	n.r. in 3 campioni	85 – 21 - 52

n.r. = microrganismi non rilevati

Nelle seguenti tabelle da 6 a 9 sono riportati i valori di Enterobatteriacee e di istamina rilevati nei campioni degli altri 4 produttori che erano stati coinvolti

Tabella 6: valori di Enterobatteriacee e Istamina negli Agoni prodotti dal produttore 2

Giorno del prelievo	Enterobatteriacee (log ufc/g)	Istamina (mg/kg)
Tempo 0	2.70	< 10
2gg	1.27	< 10
27 gg	n.r.	< 10
30 gg	n.r.	< 10
66 gg	n.r.	< 10
122 gg	n.r.	18

n.r. = microrganismi non rilevati

Tabella 7: valori di Enterobatteriacee e Istamina negli Agoni prodotti dal produttore 3

Giorno del prelievo	Enterobatteriacee (log ufc/g)	Istamina (mg/kg)
Tempo 0	3.06	< 10
2gg	3.90	< 10
25 gg	3.24	< 10
31 gg	n.r.	< 10
94 gg	n.r.	10
138 gg	n.r.	90
164 gg	n.r.	101

n.r. = microrganismi non rilevati

Tabella 8: valori di Enterobatteriacee e Istamina negli Agoni prodotti dal produttore 4

Giorno del prelievo	Enterobatteriacee (log ufc/g)	Istamina (mg/kg)
Tempo 0	n.r.	< 10
2gg	n.r.	< 10
21 gg	n.r.	< 10
23 gg	2.76	< 10
92 gg	n.r.	< 10
123 gg	n.r.	< 10

n.r. = microrganismi non rilevati

Tabella 9: valori di Enterobatteriacee e Istamina negli Agoni prodotti dal produttore 5

Giorno del prelievo	Enterobatteriacee (log ufc/g)	Istamina (mg/kg)
Tempo 0	1.47	< 10
2gg	1.47	< 10
18 gg	n.r.	< 10
20 gg	n.r.	< 10
89 gg	2.47	< 10
120 gg	n.r.	< 10

n.r. = microrganismi non rilevati

6.1.3 Considerazioni finali

Come si può desumere dai grafici da 1 a 8 malgrado il prodotto sia lo stesso, i parametri microbiologici degli Agoni essiccati e conservati sott'olio dei diversi produttori considerati mostrano una notevole variabilità, tanto che nessuno dei parametri può essere considerato come una popolazione che mostra un andamento riconducibile a uno standard di prodotto. Si sottolinea come alcuni potenziali pericoli

microbiologici ipotizzati prima di questo lavoro, come contaminazione da *Listeria monocytogenes* o con Clostridi solfito riduttori tra cui anche *Cl. botulinum* in realtà non sono mai stati evidenziati in tutti i campioni effettuate presso i 5 diversi produttori.

Per quanto riguarda la presenza di istamina sono stati evidenziati livelli sopra i limiti di legge in un produttore (identificato come produttore 1). Nel suo prodotto le Enterobatteriacee, a parte il pesce fresco in cui non sono state rilevate, sono risultate a concentrazione compresa tra 3 e 4 log ufc/g, sia nel prodotto a fine salatura, sia in quello a fine essiccazione, con evidenziazione di livelli significativi di istamina, sia in quello alla fine della fase di conservazione del prodotto sott'olio cioè nell'alimento pronto per la fase di commercializzazione (dopo circa 70 giorni) con livelli di istamina ben al di sopra dei limiti di legge. Con il procedere dei campionamenti del prodotto in una prima fase sembrerebbe esserci, a fronte del mantenimento delle Enterobatteriacee a concentrazione sostanzialmente costante, un progressivo accumulo di istamina. Successivamente a partire dal prodotto al 90° giorno le Enterobatteriacee sono risultate non più rilevabili, mentre l'istamina ha mantenuto livelli elevati anche se a concentrazione decrescente rispetto al valore riscontrato nel prodotto a 70 giorni. Si deve sottolineare che in ogni lotto di Agoni essiccati e conservati sott'olio che viene lavorato non vi sia omogeneità e pertanto che nella massa del prodotto, pesci diversi presumibilmente possono presentare nei diversi stadi di lavorazione livelli differenti di contaminazione di Enterobatteriacee, quindi stadi di conservazione differenti e questo può portare anche a differenze nella velocità di accumulo di istamina nell'alimento. Ciò presumibilmente fornisce una spiegazione al dato anomalo costituito da una concentrazione di istamina che sembrerebbe diminuire nei campioni prelevati al 90° e 120° giorno dato che non è scientificamente ipotizzabile che l'istamina una volta formata venga degradata e quindi ci si sarebbe aspettato un progressivo aumento della sua concentrazione. Presenza della sostanza tossica è stata riscontrata, a livelli variabili, anche in tutti gli altri lotti di prodotto prelevati dallo stesso produttore, in un paio con valori al di sopra dei limiti di legge. Nel prodotto di un secondo produttore, che aveva presentato livelli di Enterobatteriacee compresi tra 3 e 4 log ufc/g nelle prime fasi di lavorazione è stata evidenziata la presenza di sostanza tossica seppur e a livelli inferiori a 100 mg/kg nei campionamenti effettuati durante la commercializzazione del prodotto, mentre negli altri 3 produttori in cui i valori le enterobatteriacee sono state rilevate sporadicamente e comunque in concentrazione inferiore a 3 log ufc/g l'istamina o non è stata rilevata o era presente a valori trascurabili. L'effettuazione di un sopralluogo presso le strutture di produzione del produttore 1 che aveva presentato i livelli elevati di istamina ha portato all'individuazione di alcuni punti nel processo produttivo di potenziale contaminazione crociata tra lotti di prodotto a differenti fasi di lavorazione.

La ricampionatura del prodotto del medesimo produttore nella successiva stagione produttiva ha mostrato presenza di Enterobatteriacee a concentrazione elevata solo nel pesce fresco con valori di istamina riscontrati, seppur a valori contenuti, solo dopo il 150° giorno e peraltro al di sotto di 100 mg/kg anche nel prodotto con oltre 200 giorni.

L'esperienza effettuata suggerisce come alcuni interventi orientati al miglioramento delle condizioni di pulizia e sanificazione degli ambienti di lavorazione e alla correzione delle procedure

di lavorazione tese a mantenere una contaminazione entro limiti accettabili nelle prime fasi di lavorazione e ad eliminare eventuali punti di contaminazione crociata, sembrerebbero aver portato al contenimento del problema.

6.2 Effetto della temperatura di stoccaggio sulla crescita di *Morganella psychrotolerans* e sulla formazione di istamina

Gli agenti patogeni associati ai prodotti della pesca, identificati nella sezione precedente, in grado di crescere a temperature refrigerate, sono stati inclusi nelle attività di modellizzazione, utilizzando software di modellazione predittiva per prevedere l'effetto della temperatura e del tempo di conservazione sulla crescita di patogeni quali *M. psychrotolerans* come produttore di istamina.

La crescita di patogeni e valori di formazione di istamina sono stati utilizzati, sulla base di dati dalla letteratura (Emborg e Dalgaard, 2008). Le ipotesi per i fattori che influenzano la crescita batterica sono mostrate nella Tabella 10; inoltre, si deve notare che l'effetto che la confezione potrebbe avere sulla temperatura del prodotto non è stato valutato. Le temperature utilizzate in questa valutazione si presumono quindi riflettano quelle del prodotto.

Tabella 10: Parametri utilizzate per la previsione della crescita microbica nei prodotti della pesca – Fonte: EFSA Journal 2015;13(7):4162

Factor	Assumption
pH	6.5
Water phase salt	1%
Initial concentration of histidine	10 750 ppm
Initial concentration of <i>Morganella psychrotolerans</i>	1 000 CFU/g
Lag phase	No lag phase

CFU: colony-forming unit.

L'incertezza delle previsioni relative alle suddette ipotesi è stata analizzata per la produzione di istamina, che è stata identificata come il principale pericolo per i prodotti della pesca. L'incertezza è stata valutata stimando il tempo necessario per la formazione di istamina a 100 ppm ad una temperatura di riferimento di 5 °C per un intervallo di valori rappresentativi di pH, sale in fase acquosa, concentrazione iniziale di istidina e concentrazione iniziale e fase di latenza di *M. psychrotolerans*, sulla base di dati dalla letteratura (Emborg e Dalgaard, 2008). La direzione dell'effetto è stata espressa quantitativamente come la differenza percentuale, dal tempo previsto in base all'assunzione iniziale

6.2.1 Materiali e Metodi

Per prevedere l'effetto della temperatura sulla crescita e la formazione di istamina da parte di *M. psychrotolerans* in prodotti ittici confezionati a livello di vendita al dettaglio, è stato utilizzato il Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP TM) v. 4.0 (www.fssp.dtu.dk). Le caratteristiche del modello sono mostrate nella Tabella 11.

Tabella 11: Caratteristiche di FSSP™ v. 4.0 per la crescita di *Morganella psychrotolerans* e la formazione di istamina e le ipotesi utilizzate per la previsione della crescita microbica nei prodotti della pesca– Fonte: EFSA Journal 2015;13(7):4162

Model ^(a)	Characteristic
Primary growth model	Expanded logistic model with delay
Secondary growth model	Cardinal parameter type model
Environmental parameters in model	Temperature, atmosphere (CO ₂), water phase salt (a _w) and pH
Product validation studies	Fresh garfish, fresh tuna, canned tuna and cold-smoked tuna (Emborg and Dalgaard, 2008)
Range of applicability	Temperature (0–20 °C), atmosphere (0–100 % CO ₂), water phase salt (0–6 %), pH (5.4–6.5)
Applied values	
Temperature	1–7 °C
pH	6.5
Water phase salt	1 %
Initial concentration of histidine	10 750 ppm
Initial concentration of histamine	0 ppm
Initial concentration of <i>M. psychrotolerans</i>	1 000 CFU/g
CO ₂ %	0 %, 20 %, 30 %, 40 %
Lag phase	No lag phase

CFU: colony-forming unit.

(a): FSSP™ v. 4.0 is available at www.fssp.dtu.dk

Questo modello per *M. psychrotolerans* include l'effetto di quattro parametri ambientali (temperatura, atmosfera (CO₂), attività dell'acqua (sale in fase acquosa) e pH) sulla crescita e sulla formazione di istamina. FSSP™ può essere usato per valutare come cambiamenti nelle condizioni di conservazione (per esempio la temperatura di conservazione del freddo) o le caratteristiche del prodotto (per esempio concentrazione di sale) influenzino la crescita e la formazione di istamina da parte di *M. psychrotolerans*. Le informazioni sul tempo di latenza di *M. psychrotolerans* in prodotti ittici marini contaminati naturalmente sono limitate, pertanto, il modello per *M. psychrotolerans* è stato utilizzato senza considerare una fase di latenza (previsioni di sicurezza). FSSP™ utilizza un tempo di ritardo relativo di 2,55 ore per *M. psychrotolerans* (Emborg and Dalgaard, 2008).

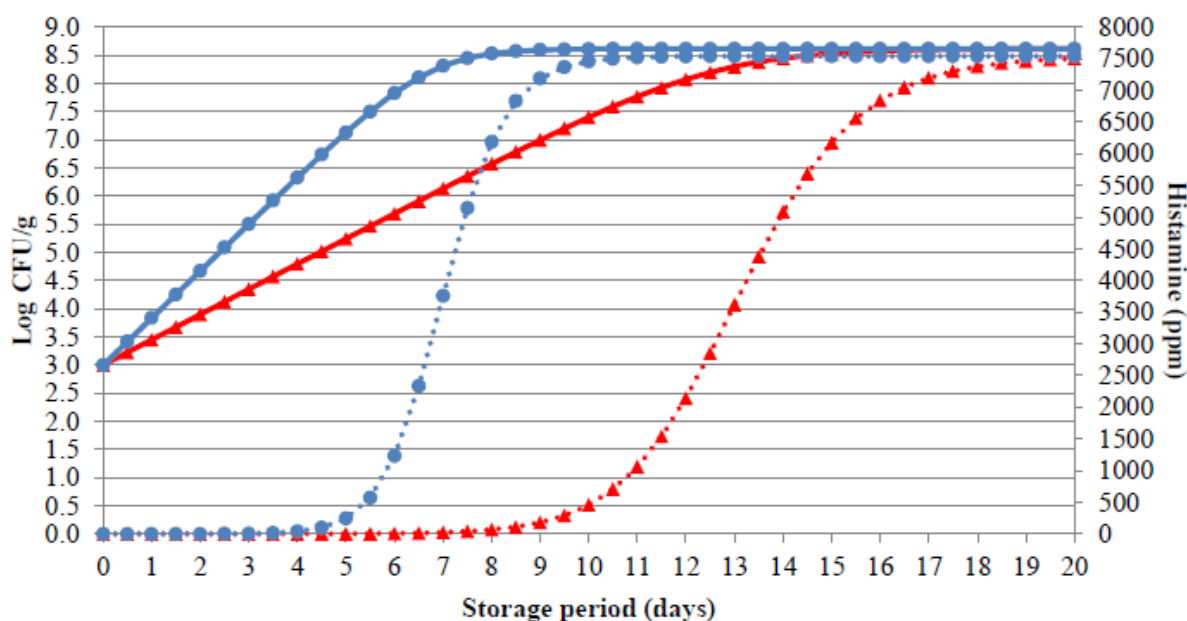
6.2.2 Risultati

La formazione di istamina nei prodotti della pesca a temperature ambiente compresa tra 0 e 7 ° C e per periodi di conservazione da 1 a 14 giorni sono stati previsti usando FSSP™. La previsione della formazione di istamina si basa sulla crescita di *M. psychrotolerans* produttore di istamina. La selezione del modello di *M. psychrotolerans* si basava sul fatto che cresce più velocemente di *M. morganii* alle temperature di refrigerazione (16). La figura 9 mostra un confronto rappresentativo: la crescita di *M. psychrotolerans* e formazione di istamina in prodotti della pesca a 2 e 5 ° C con 0% di CO₂ nell'area di testa dell'imballaggio in equilibrio. Come mostrato in questa figura, l'istamina si forma quando la popolazione di *M. psychrotolerans* raggiunge circa 6,5 log CFU / g. L'effetto della temperatura e del tempo di conservazione sulla formazione di istamina nei prodotti della pesca con vari livelli di CO₂ nello spazio di testa del pacchetto è presentato nelle tabelle 12-14. La tabella 15 mostra l'effetto della temperatura di stoccaggio e della CO₂

nello spazio di testa del pacchetto sul tempo necessario per la produzione di 100 ppm di istamina, che è il limite inferiore (m) del criterio di sicurezza per i prodotti della pesca provenienti da specie ittiche associate a una grande quantità di istidina, comprese le famiglie *Sgombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae*, *Pomatomidae* e *Scomberesocidae*.

Pertanto, il tempo di produzione di 100 ppm di istamina indica un tempo massimo di conservazione del prodotto, supponendo che la concentrazione iniziale di istamina sia 0.

Figura 9: Crescita prevista di *M. psychrotolerans* (-) e formazione di istamina (...) in prodotti della pesca (pH 6,5, sale in fase acquosa = 1%, CO₂ = 0%) durante il periodo di conservazione di 20 giorni a 2 ° C (▲) e 5 ° C (●), assumendo lag fase pari a zero– Fonte: EFSA Journal 2015;13(7):4162



I risultati nella Tabella 12 indicano che, assumendo una concentrazione iniziale di istamina di 0 ppm, la formazione di istamina rimane sotto 100 ppm per un massimo di 10 giorni a seconda della temperatura di conservazione. Ad esempio, questo limite sarebbe rispettato per 8 giorni e una temperatura di conservazione di 2 ° C.

Presupposti applicati in tutte le simulazioni: pH (6,5), sale in fase acquosa (1%), concentrazione iniziale di *M. phsychrotolerans* (1 000 unità formanti colonia (CFU) / g), concentrazione iniziale di istidina (10750 ppm), concentrazione iniziale di istamina (0 ppm), nessuna fase di latenza.

L'ombreggiatura grigia indica le combinazioni tempo-temperatura che portano alla produzione di istamina inferiore a 100 ppm.

Tabella 12: Formazione prevista di istamina dovuta alla crescita di Morganella in prodotti ittici con 0% di CO₂ nello spazio di testa dell'imballaggio all'equilibrio come influenzato dalla temperatura durante il trasporto e lo stoccaggio al dettaglio - Fonte: EFSA Journal 2015;13(7):4162

Time (days)	Temperature (° C)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Histamine formation (ppm)								
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	1	2	4
3	0	0	0	1	2	6	17	53
4	0	0	1	3	11	39	155	629
5	0	1	3	12	52	245	1 122	3 647
6	1	2	9	43	235	1 234	4 136	6 727
7	1	5	25	150	928	3 758	6 659	7 439
8	2	11	68	486	2 688	6 191	7 382	7 532
9	4	23	181	1 364	5 028	7 191	7 517	7 543
10	7	51	459	2 994	6 586	7 461	7 540	7 545
11	12	110	1 064	4 896	7 232	7 526	7 544	7 545
12	22	231	2 148	6 289	7 449	7 540	7 545	7 545
13	39	470	3 621	7 019	7 516	7 544	7 545	7 545
14	69	907	5 085	7 337	7 536	7 544	7 545	7 545

ppm: parts per million.

I risultati nelle tabelle da 13 a 15 mostrano l'effetto della CO₂ nello spazio di testa del confezionamento oltre alla temperatura e alla durata dello stoccaggio, assumendo anche una concentrazione iniziale di istamina di 0 ppm. Ad esempio, per una temperatura di 2 ° C la formazione di istamina rimane inferiore a 100 ppm per un massimo di 10,6 giorni a seconda della concentrazione di CO₂, rispetto agli 8,4 giorni di conservazione senza CO₂ (vedere Tabella 15).

Tabella 13: Formazione prevista di istamina dovuta alla crescita di *M. psychrotolerans* in prodotti ittici con il 20% di CO₂ nello spazio di testa dell'imballaggio all'equilibrio influenzato dalla temperatura durante il trasporto e lo stoccaggio al dettaglio. La sfumatura grigia indica le combinazioni tempo-temperatura che portano alla produzione di istamina inferiore a 100 ppm- Fonte: EFSA Journal 2015;13(7):4162

Time (days)	Temperature (°C)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Histamine formation (ppm)								
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	1	1	3
3	0	0	0	1	2	4	9	25
4	0	0	1	2	6	19	63	221
5	0	1	2	7	24	94	387	1 466
6	1	2	5	20	90	426	1 770	4 550
7	1	3	13	61	322	1 551	4 458	6 561
8	1	6	30	175	1 006	3 728	6 342	7 066
9	2	12	72	475	2 467	5 725	6 974	7 158
10	4	24	166	1 156	4 385	6 696	7 130	7 173
11	7	46	370	2 370	5 874	7 032	7 166	7 176
12	11	89	778	3 924	6 652	7 134	7 174	7 176
13	19	170	1 496	5 313	6 979	7 164	7 176	7 176
14	31	317	2 548	6 232	7 104	7 173	7 176	7 176

Tabella 14: Formazione prevista di istamina dovuta alla crescita di *M. psychrotolerans* in prodotti ittici con il 40% di CO₂ nello spazio di testa dell'imballaggio all'equilibrio influenzato dalla temperatura durante il trasporto e lo stoccaggio al dettaglio. La sfumatura grigia indica le combinazioni tempo-temperatura che portano alla produzione di istamina inferiore a 100 ppm- Fonte: EFSA Journal 2015;13(7):4162

Time (days)	Temperature (° C)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Histamine formation (ppm)								
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	1	1	2
3	0	0	0	1	1	2	5	12
4	0	0	1	2	4	10	27	82
5	0	1	2	4	12	39	134	480
6	0	1	3	11	38	147	588	2 006
7	1	2	7	27	114	512	1 953	4 561
8	1	4	15	67	330	1 486	4 137	6 151
9	2	7	31	163	866	3 200	5 785	6 661
10	3	12	64	380	1 925	4 948	6 494	6 788
11	4	21	130	829	3 422	6 033	6 727	6 817
12	6	37	258	1 622	4 859	6 525	6 797	6 824
13	10	65	497	2 756	5 840	6 717	6 817	6 825
14	15	113	908	4 009	6 372	6 787	6 823	6 825

Tabella 15: Tempi previsti (giorni) richiesti per la formazione di istamina da 100 ppm nei prodotti della pesca in cui la CO₂ è presente nello spazio di testa dell'imballaggio in equilibrio e temperatura durante il trasporto e lo stoccaggio - Fonte: EFSA Journal 2015;13(7):4162

Temperature (° C)	CO ₂ in the packaging headspace at equilibrium (%)			
	0	20	30	40
Storage time (days) providing 100 ppm histamine formation				
0	14.7	16.4	17.4	18.6
1	10.9	12.2	12.9	13.7
2	8.4	9.4	10.0	10.6
3	6.6	7.5	7.9	8.4
4	5.4	6.0	6.4	6.9
5	4.5	5.0	5.3	5.7
6	3.8	4.2	4.5	4.8
7	3.2	3.6	3.8	4.1

6.2.3 Considerazioni finali

Il controllo della temperatura di stoccaggio è uno degli approcci per garantire che i prodotti alimentari non contengano una concentrazione inaccettabile di pericoli microbici al momento del consumo. Tuttavia, questo requisito esiste in parallelo con vari altri obblighi legislativi, come il requisito

per gli operatori di stabilire la durabilità del prodotto, l'obbligo di identificare i pericoli e gestire i rischi risultanti all'interno del sistema di gestione della sicurezza alimentare attraverso i criteri microbiologici richiesti.

Per l'istamina, i risultati dell'approccio di modellizzazione hanno dimostrato che, per un prodotto della pesca con determinate caratteristiche (pH 6,5, sale in fase acquosa = 1%, concentrazione istidina iniziale = 10750 ppm e concentrazione iniziale di *M. psychrotolerans* = 1 000 CFU / g), una shelf-life di 14,7 giorni e 0% di CO₂ nello spazio di testa dell'imballaggio all'equilibrio che è immagazzinato nel ghiaccio (0 ° C), la formazione di istamina sarebbe di 100 ppm (limite inferiore del criterio di sicurezza nel regolamento (CE) n. 2073/2005) alla fine della sua shelf-life, assumendo una concentrazione iniziale di istamina di 0 ppm. Pertanto, una condizione equivalente allo scenario di riferimento di cui sopra è qualsiasi combinazione di temperatura di conservazione, shelf-life e concentrazione di CO₂ nella confezione che porta alla formazione di 100 ppm istamina alla fine della shelf-life.

Sulla base di quanto sopra, i modelli predittivi disponibili per la formazione di istamina possono essere utilizzati dagli OSA per regolare la durabilità del prodotto della pesca (massima shelf-life) e / o modificare l'atmosfera di imballaggio del prodotto in base alla temperatura di vendita al fine di garantire la conformità con la sicurezza del prodotto riferito al criterio istamina.

7 Verifica del processo di produzione

L'assunzione di cibi con alto contenuto di istamina, pur essendo un problema noto da tempo, si può considerare una emergenza costante e va tenuto monitorata in continuo. Infatti, il cambio delle abitudini alimentari e dello stile di vita, con consumo frequente di alimenti di consumo veloce hanno portato ad un incremento dell'assunzione di tonno, uno dei pesci che più sviluppano istamina se non conservati in condizioni idonee, sia sott'olio che fresco. **Nei punti di ristorazione come nel consumo domestico la cattiva conservazione risulta essere il problema di gran lunga più importante legato allo sviluppo di istamina.** Per i prodotti inscatolati invece la presenza di olio garantisce condizioni anaerobiche impedendo lo sviluppo di istamina mentre la confezione aperta con il contenuto non adeguatamente ricoperto di olio costituisce una condizione favorevole per il suo sviluppo. **Nel prodotto fresco è invece la temperatura di conservazione il fattore critico e la decongelazione di pezzi di tonno mantenuti poi a lungo a temperatura non adeguata costituisce una condizione ottimale per lo sviluppo di istamina.**

Il basso riscontro di presenza di istamina negli alimenti in seguito a MTA è da attribuirsi principalmente alla mancanza di alimenti non consumati da poter analizzare.

Nel corso del periodo 2015 – 2017, sono state svolte dalle Autorità Sanitarie Competenti in ambito di attività di Controllo Ufficiale, le analisi di seguito riportate, relative a Istamina nei prodotti della pesca; i dati si riferiscono all'ambito di competenza territoriale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, come riportato dalla rendicontazione dell'attività svolta dal Centro di Referenza Nazionale per i Rischi Emergenti in Sicurezza degli Alimenti (CRESA).

7.1 Attività rendicontata nel 2016

L'aumento delle segnalazioni di MTA con sindrome sgombroide conferma l'andamento degli ultimi anni. Tra il finire del 2015 e durante il 2016 sono state segnalate al laboratorio di Bologna 14 tossinfezioni, 1 campionamento su sospetto e 1 segnalazione del consumatore. In Emilia Romagna in 5 dei campioni segnalati come tossinfezioni sono state riscontrate concentrazioni di istamina superiori ai limiti massimi previsti dal Regolamento 2073/2005, con concentrazione massima di 3701 mg/kg. In Lombardia 23 sono state le segnalazioni di irregolarità, 7,8% e praticamente tutte a seguito di tossinfezione ma in altri casi non è stato possibile procedere alla segnalazione essendo stata notificata la tossinfezione a livello domestico su campione non sigillato.

IRREGOLARI (SEGNALAZIONE DI TOSSINFEZIONI/MTA)	N° CAMPIONI	MATRICE
A.U.S.L. - SIAN - Imola	2	Tonno
A.U.S.L. REGGIO EMILIA - AREA TERR. REGGIO EMILIA	2	Tonno
A.U.S.L. REGGIO EMILIA - AREA TERR. SCANDIANO	1	Tonno
LOMBARDIA	23	Prod. ittici

Complessivamente i conferimenti sono stati 365; alcuni dei campioni ufficiali conferiti sono stati prelevati in 9 unità campionarie in base al Regolamento 2073/2005 per cui le analisi effettuate sono state complessivamente 174. L'attività di monitoraggio effettuata rientra in gran parte nel Piano Regionale Alimenti (35 conferimenti – 85 analisi). Sono invece calati notevolmente i prelievi del posto di ispezione frontaliere di Malpensa, cinque in tutto. L'attività di verifica è stata concentrata prevalentemente sul prodotto fresco.

FINALITÀ	N° CONFERIMENTI	N° CAMPIONI
Piano Regionale Alimenti (Emilia Romagna)	35	85
Controllo alimenti	19	30
Autocontrollo	9	25
Attività di controllo UVAC	7	32
Attività di controllo NAS	2	2
Piano Lombardia	/	293
Totale complessivo	72	365

Tra le specie ittiche, il tonno è quello maggiormente campionato sia come fresco che come conserva. Altre specie istaminogene come alici (7 campioni di alici fresche), sardine (5) e sgombro (7) sono tra quelle maggiormente campionate.

MATRICE	N° CONFERIMENTI
TONNO	35
ALICE O ACCIUGA	7
SGOMBRO/MACCARELLO	7
SARDINA/SARDA	5
FILETTI E TRANCE DI PESCE	2
ALIMENTI PRONTI	2
ARINGA	1
BIRRA	1
CONSERVE DI ALICE	1
CONSERVE DI SARDINE/SARDE	1
CONSERVE DI SGOMBRO/MACCARELLO	1
CONSERVE DI TONNO	1
FILETTO DI SARDA	1
INSALATA DI MARE	2
ORATA	1
PESCE D'ACQUA SALATA	1
PESCE SPADA	1
SALMONE	1
SPIGOLA/BRANZINO	1
PROD ITTICI	293
TOTALE	365

Il 2016 ha visto un ulteriore aumento dell'attività, nonostante dopo l'estate i prelievi dell'Emilia Romagna siano stati indirizzati al reparto chimico di Bologna. I conferimenti sono stati 293, in larga parte di tonno, prelevati sia per il piano di controllo degli alimenti sia a seguito di tossinfezione.

7.2 Attività rendicontata nel 2017

Il 2017 ha visto un ulteriore aumento dell'attività analitica. I conferimenti fino al 15 novembre sono stati 314, di cui ben 162 in nove unità campionarie per un totale di 1610 campioni analizzati.

I campioni prelevati erano sia di pesci appartenenti alla famiglia degli sgombroidi (tonno, sgombri, alici, acciughe, etc) che altri pesci non sgombroidi (salmone, trota, pesce persico, nasello) per cui il controllo dell'istamina risulta inutile.

Le segnalazioni di irregolarità sono risultate sei, corrispondenti all'1,9%, in diminuzione rispetto agli altri anni, diminuzione dovuta al minor numero di tossinfezioni alimentari legate alla sindrome sgombroide. Da segnalare una irregolarità riscontrata i filetti di acciughe inscatolate, con cinque unità campionarie positive (valori da 244 a 777 mg/kg) le cui scatolette presentavano un leggero rigonfiamento.

8 Validazione del processo di produzione

La Validazione è definita come la raccolta e la valutazione dei dati, dalla fase di progettazione alla produzione commerciale, che stabilisce evidenza scientifica che un processo è in grado di fornire costantemente prodotto di qualità.

Sulla base delle attività svolte e rendicontate, è emerso che la valutazione dei parametri tecnologici (tempo, temperatura, pH, Aw, composizione dell'atmosfera di confezionamento) in combinazione con la conoscenza dei processi di produzione riportati in ArsAlimentaria e l'utilizzo della microbiologia predittiva, consentono ai produttori di validare scientificamente nel tempo l'elevato livello igienico sanitario delle proprie produzioni.

Obiettivo della validazione è quello di documentare come i parametri di processo e di prodotto siano in grado di influenzare la dinamica di crescita e morte batterica dei batteri istamino produttori (*Enterobacteriaceae*); tra i principali parametri, saranno oggetto di valutazione:

- ✓ **il pH del prodotto al momento del confezionamento o al termine della fase di essiccamento, prima della messa sott'olio o sotto pressione.**
- ✓ l'attività dell'acqua (aw) del prodotto al momento del confezionamento o al termine della fase di essiccamento, prima della messa sott'olio o sotto pressione
- ✓ **la concentrazione di *Enterobacteriaceae* del prodotto al termine della fase di essiccamento;** per questo parametro, si suggeriscono i seguenti livelli massimi di contaminazione:
 - per prodotto pressato a temperatura ambiente (oltre 8°C): < 100 ufc/g (n=3; c=0)
 - per prodotto pressato a temperatura compresa tra 4°C e 8°C: n=3; c=1; m= 100 ufc/g, M= 1000 ufc/g
 - per prodotto pressato a temperatura inferiore a 4°C: 1000 ufc/g (n=3; c=0)

In caso di superamento dei valori indicati è necessario eseguire la ricerca di istamina su un pool di 9 campioni (n=9; c=2; m=200 mg/kg; M=400 mg/kg)

- ✓ **la temperatura di lavorazione con particolare riferimento alle fasi rappresentate dal trasporto, dalla permanenza sott'olio / sotto pressione ed alle modalità di conservazione del prodotto durante la shelf life.**

I sistemi di trasporto devono essere adeguati ed in grado di mantenere la temperatura ottimale per ogni derrata; devono essere forniti di un sistema di monitoraggio che rileva la temperatura a bordo per individuare eventuali innalzamenti della temperatura dovuti a:

- chiusura non ermetica della cella,
- apertura del portellone in fase di carico/scarico della merce,
- permanenza prolungata del veicolo sotto l'azione diretta del sole.

A temperatura ambiente, superiore a 10°C, i prodotti della pesca devono sostare per il minor tempo possibile: più basse sono le temperature, maggiore è il rallentamento dell'attività microbica!

- ✓ **la durata della permanenza sott'olio e la successiva shelf life**

La verifica dei parametri sopra esposti deve avvenire su almeno 4 lotti di produzione/anno (1 lotto a trimestre), effettuando campionamenti in triplo (per la determinazione di pH, Aw ed Enterobacteriaceae) e rilevando la temperatura del prodotto durante la fase di pressatura, sino al momento della vendita (il rilievo della temperatura dovrebbe essere effettuato in continuo, mediante datalogger in grado di registrare la temperatura).

I dati derivanti dall'attività di validazione del processo di produzione così ottenuti saranno pubblicati periodicamente all'interno dell'area riservata del sito www.ars-alimentaria.it in modo da consentire l'applicazione dei modelli di predizione, come descritto nel presente documento.

9 Allegati

Le schede di monitoraggio di seguito rappresentate evidenziano in forma sintetica, sia per il processo produttivo della Sardina essiccata che per il processo produttivo del *missultin*, i requisiti fondamentali che gli operatori del settore alimentare devono monitorare e rispettare per mantenere condizioni atte a garantire al consumatore gli indispensabili elementi di sicurezza alimentare in specie rivolte al controllo del pericolo connesso alla presenza di istamina nel prodotto ittico.

9.1 Scheda monitoraggio Processo Sardina essiccata

FASE	PARAMETRO DI MONITORAGGIO	VALORI DI RIFERIMENTO
Trasporto	Temperatura	0-4°C
Eviscerazione	Temperatura	0-4°C
	Enterobacteriaceae	1000 ufc/g (n=3; c=0)
Salatura a secco	Temperatura	Max: 12°C
Lavaggio		
Essiccazione	Temperatura	Max 12°C
	pH (fine essiccazione)	6.0 – 6.5
Pressatura	Temperatura	Max 12°C
	Aw (inizio pressatura)	Max 0.95

9.2 Scheda monitoraggio Processo Missoltino essiccato

FASE	PARAMETRO DI MONITORAGGIO	VALORI DI RIFERIMENTO
Trasporto	Temperatura	0-4°C
Eviscerazione	Temperatura	0-4°C
	Enterobacteriaceae	1000 ufc/g (n=3; c=0)
Salatura a secco	Temperatura	Max: 12°C
Lavaggio		
Essiccatura	Temperatura	Max 12°C
	pH (fine essiccatura)	6.0 – 6.5
Pressatura	Temperatura	Max 12°C
	Aw (inizio pressatura)	Max 0.95
- Temperatura 4-8°C	Enterobacteriaceae	1000 ufc/g (n=3; c=0)
- Temperatura oltre 8°C	Enterobacteriaceae	n=3; c=1; m= 100 ufc/g, M= 1000 ufc/g
	Enterobacteriaceae	< 100 ufc/g (n=3; c=0)

10 Bibliografia citata nel testo

1. P.R.P.A. PROGRAMMA TRIENNALE REGIONALE PER LA PESCA E L'ACQUACOLTURA 2017-2019.
2. Malle P, Valle M and Bouquelet S, 1996. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *Journal of AOAC International*, 79, 43–49.
3. Duflos G, Dervin C, Malle P and Bouquelet S, 1999. Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangus merlangus*). *Journal of AOAC International*, 82, 1097–1101..
4. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization), 2013 Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting report. Rome: FAO Headquarters 1–111. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/89216/1/9789240691919_eng.pdf?ua=1
5. CAC (Codex Alimentarius Commission), 1999. Principles and guidelines for the conduct of Microbiological Risk Assessment. Food Hygiene Series. CAC/GL 30..
6. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 2015;13(1):3991, 162 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.3991.
7. Huss HH, Reilly A and Ben Embarek PK, 2000. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control*, 11, 149–156.
8. Lampila LE and McMillin KW, 2012. Major microbial hazards associated with packaged seafood. In: *Advances in Meat, Poultry and Seafood Packaging*. Ed Kerry JP, Woodhead Publishing in Food Science Technology and Nutrition, 59–85.
9. Dalgaard P, Madsen HL, Samieian N and Emborg J, 2006. Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*) - effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 80–95.
10. Ruiz-Capillas C and Moral A, 2004. Free amino acids and biogenic amines in red and white muscle of tuna stored in controlled atmospheres. *Amino Acids*, 26, 125–132.
11. Kanki M, Yoda T, Ishibashi M and Tsukamoto T, 2004. *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 79–87..
12. Klausen NK and Huss HH, 1987. Growth and histamine production by *Morganella morganii* under various temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 5, 147–156.
13. Fletcher GC, Summers G, Winchester RV and Wong RJ, 1995. Histamine and histidine in New Zealand marine fish and shellfish species, particularly kahawai (*Arripis trutta*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 4, 53–74.
14. Fletcher GC, 2010. Research of relevance to histamine poisoning in New Zealand. A review. Ministry of Agriculture and Forestry, MAF Technical Paper No: 2011/70. Available at: <http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/2011-70-histamine-poisoning.pdf>.

15. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2011a. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA Journal 2011;9(10):2393, 93 pp. doi:10.2903/j.efsa.2011.2393.
16. Emborg J and Dalgaard P, 2008. Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation by *Morganella psychrotolerans*. International Journal of Food Microbiology, 128, 226–233.

11 Altre fonti Bibliografiche e sitografiche

17. http://slowfood.com/slowfish/pagine/ita/blog/dettaglio.lasso?id_edit=646
18. http://slowfood.com/slowfish/pagine/ita/blog/dettaglio.lasso?id_edit=643
19. www.ars-alimentaria.it
20. <http://fssp.food.dtu.dk/windowsdownload.aspx>