

ACCERTAMENTI ISPETTIVI APPROFONDITI SUL PESCE CASTAGNA (*BRAMA RAJI*)

Inspective investigation on Atlantic pomfret (Brama raji)

Giarratana Filippo*, Muscolino Daniele, Ferrara Piergigi, Panebianco Antonio

*Corresponding author. Tel: (+39) 90 3503768; Fax: (+39) 90 3503937. E-mail: fgiarratana@unime.it
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Messina, Messina, Italia.

ABSTRACT

The present study was carried out on 21 specimens of *Brama raji* collected at fish markets of Sicily and Calabria between april 2011 and march 2012. The detection of total *Enterobacteriaceae*, *Vibrio* spp. and Specific Spoilage Bacteria from gills, intestine, skin and muscle during storage (336h) was carried out. 34 *Vibrio* spp. (*rpoA+*) strains were isolated from gills and skin. The subsequent identification of species by multiplex PCR (gene collagenase) allowed to establish that 33 strains were *V. alginolyticus* and one was *V. parahaemolyticus*. The anatomopathological examination of muscle tissue showed that 15 specimens (71.4%) were positive for the presence of larvae of *Gymnorhynchus gigas*. The determination of TVB-N and TMA-N was made on muscle portions around the parasite, on larvae of *G. gigas* and on muscle portions parasite-free. The TVB-N and TMA-N contents of each sample were measured using the Conway microdiffusion method. The higher values of TVB-N (31.6 mg/100g) and TMA-N (8.5 mg/100g) were observed at 336 hours of storage. No statistically significant differences between muscle parasite-free and muscle around the parasite for TVB-N and TMA-N were observed during storage. Parasites of genus *Koellikeria filicollis*, *Sphiriocephalus tergestinus* and *Anisakis* spp. were also observed.

Keywords: *Brama raji*, TMA-N, TVB-N, Parasite, QIM.

INTRODUZIONE

Il pesce castagna (*Brama raji*) (Bloch & Schneider, 1801), noto anche come *B. brama* (Bonna-terre, 1788) o *B. rayi* (Bloch, 1791), è l'unico rappresentante della famiglia *Bramidae* ad essere presente nel Mediterraneo. Può raggiungere i 100 cm di lunghezza e il peso massimo di 6 kg. Questa specie ittica così come il pesce sciabola (*Lepidopus caudatus*) è nota agli addetti del settore poiché le sue carni risultano frequentemente infestate dallo stadio larvale del cestode *Gymnorhynchus gigas* (Panebianco, 1952, 1953). Tale parassita, che nel *B. raji* può raggiungere dimensioni notevoli (anche un metro), è in grado di determinare notevoli alterazioni a carico della muscolatura. Queste, talora visibili nel pesce appena catturato, sono rappresentate da macchie grigiastre e risultano maggiormente evidenti quando il parassita si ritrova negli strati più superficiali della muscolatura e quindi più vicini alla cute (Panebianco, 1952). Il tessuto muscolare attorno al parassita può assumere una colorazione giallastra rispetto a quella bianco-rosata del muscolo sano e rileva istologicamente quadri

di miosite interstiziale e fatti atrofico-degenerativi (Panebianco, 1952).

Tali lesioni e il parassita stesso, possono incidere negativamente sulla conservabilità e sulla corretta valutazione ispettiva del pesce castagna, influenzando direttamente le caratteristiche organolettiche (diminuzione della consistenza della muscolatura) e indirettamente interferendo sui parametri analitici (chimici e microbiologici) utilizzati per la valutazione della freschezza. Dalle larve di questi cestodi prelevate da esemplari di *L. caudatus* sono stati infatti isolati diversi batteri Gram negativi sia potenzialmente patogeni (*Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis*) che alteranti (*Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Erwinia* sp.) pienamente appartenenti agli SSOs (Specific Spoilage Organisms) responsabili della formazione di Trimetilammina-azoto (TMA-N) (Panebianco *et al.*, 1997). Giuffrida *et al.* (2002) evidenziano un'attività proteolitica di tipo collagenasico delle larve, e recentemente Panebianco *et al.* (2011) riportano valori di più elevati di azoto volatile basico totale (ABVT) nel muscolo parassitato rispetto a quello non parassitato, sempre di *L. caudatus*.

L'interesse di tali problematiche unitamente alla sentita utilità di indicazioni ispettive specie specifiche, ci hanno spinti ad approfondire alcune di dette valutazioni su *B. raji*.

MATERIALI E METODI

Per la presente indagine sono stati analizzati 21 esemplari di *Brama raji* prelevati da mercati ittici e pescherie della Sicilia e della Calabria nel periodo compreso tra aprile 2011 e marzo 2012. Tutti gli esemplari venivano trasportati a temperatura di refrigerazione presso i laboratori della Sezione di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, per le successive valutazioni analitiche.

15 dei 21 esemplari, erano costituiti da un gruppo omogeneo: dimensioni sovrapponibili (peso e lunghezza), stesso metodo di pesca (strascico), stesso giorno e stessa area di cattura (FAO 27, Atlantico Nord-Est, Spagna). Tutti gli esemplari, mantenuti a 0-2°C, venivano successivamente suddivisi in gruppi costituiti da tre soggetti e analizzati ad intervalli di 96, 120, 144, 264 e 336 ore.

I restanti 6 *B. raji*, di dimensioni estremamente variabili, invece, erano stati pescati con la tecnica del palangrese di profondità, in diversi distretti acquei della zona Fao 37 (Fao 37.1.3 e Fao 37.2.2). Tutti i campioni venivano processati entro 12 ore dalla cattura, ad eccezione di un esemplare che ci perveniva dopo circa 120 ore dalla cattura.

Su tutti gli esemplari, ad ogni intervallo di campionamento stabilito, si procedeva preliminarmente ad una valutazione sensoriale dei caratteri di freschezza, secondo quanto riportato nell'allegato I del Regolamento CE 2406/96 e basandosi sul Quality Index Method (QIM) per l'orata, al fine di modellare uno specifico QIM.

Da ogni soggetto si prelevavano inoltre sterilmente, porzioni di cute, della muscolatura, delle branchie e il contenuto intestinale, su cui si procedeva alla:

- determinazione dei Batteri Alteranti (SSOs) su Iron Agar di Levine incubato a 25°Cx120 ore;
- determinazione degli Enterobatteri Totali con semine in piastre di Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) (Oxoid) incubate a 37°Cx24h;
- determinazione quali-quantitativa di *Vibrio spp.* con semine su Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS) (Oxoid), al 3% di NaCl, incubato a 37°Cx24h.

Per la discriminazione del genere *Vibrio spp.* tutte le colonie, con crescita caratteristica su TCBS, venivano sottoposte alle prove di crescita descritte da Ottaviani *et al.* (2003) su Kligler Iron Agar (KIA, Oxoid), in presenza del fattore vibriostatico O/129 (dischetti da 150 µg - Oxoid) e su Brain Heart infusion (Oxoid) al 3% di NaCl. Tutti i ceppi, risultati Gram -, ossidasi +, con tipica crescita in KIA, sensibili al fattore vibriostatico O/129 e capaci di sviluppare in presenza del 3% di NaCl

venivano successivamente sottoposti ad analisi biomolecolare.

L'estrazione del DNA dei batteri, preliminarmente seminati in Triptone Soya Broth salato al 2% per 24 ore, veniva effettuata mediante bollitura per 10'. Il DNA di tutti i ceppi, previa quantificazione spettrofotometrica, era sottoposto ad indagine biomolecolare per la conferma del genere *Vibrio* mediante la ricerca del gene *rpoA*. In particolare si impiegavano primers specifici amplificanti una porzione del gene *rpoA*, (*rpoA-F* e *rpoA-R*) secondo la metodica descritta da Dalmaso *et al.* (2009).

Accertata l'appartenenza al genere *Vibrio spp.*, si procedeva all'identificazione di specie utilizzando una PCR multiplex mediante l'impiego di primers specifici per *V. alginolyticus* (VA-F e VA-R) e *V. parahaemolyticus* (VP-F e VP-R) codificanti una porzione del gene collagenasi, secondo la metodica descritta da Di Pinto *et al.* (2005).

Tutti i prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante Gel Doc dopo elettroforesi a 110V per 50 minuti su gel di agarosio al 3% e colorazione con bromuro d'etidid.

Successivamente, tutti gli esemplari venivano sottoposti ad attento esame anatomo-patologico e in caso di riscontro di lesioni macroscopiche queste venivano prelevate, fissate in formalina tampognata al 10%, incluse in paraffina e le sezioni ottenute colorate con Ematossilina-Eosina (EE).

Nel contesto dell'esame anatomo-patologico ogni esemplare veniva sfilettato al fine di poter effettuare l'analisi del pH ed i prelievi di muscolatura per la successiva determinazione dell'ABVT e della TMA-N. La sfilettatura consentiva inoltre di evidenziare le eventuali localizzazioni parassitarie muscolari. Non si procedeva ad identificazione microscopica delle larve, considerata la nota, assoluta, prevalenza di *Gymnorhynchus spp.* in *B. raji* nell'ambito dei macroparassiti muscolari, non disgiunta dalle caratteristiche macroscopiche delle localizzazioni e delle larve. Da ogni esemplare di pesce castagna parassitato, in base alla localizzazione del parassita, si prelevavano i seguenti campioni:

- M: pool di porzioni di muscolatura non infestata, prelevato ad almeno 10cm di distanza dalle localizzazioni parassitarie;
- MP: pool di tutte le porzioni di muscolatura, immediatamente circostante le localizzazioni parassitarie;
- P: larva/e estratta/e dalla/e porzione/i di muscolatura parassitata.

Tutte le unità campionarie venivano processate per la determinazione dell'ABVT e della TMA-N, secondo la metodica di Conway e Byrne (1933) che rientra tra le metodiche previste dal Regolamento CE 2074/05. In particolare, ogni campione era preliminarmente triturato, pesato con bilancia di precisione (Precisa A180) ed omogeneizzato

(volume 1:4) con acido tricloroacetico (TCA) (Carlo Erba) al 4% in soluzione acquosa, ed infine centrifugato a 3000 rpmx10'. La valutazione di ABVT e di TMA-N veniva effettuata con il metodo della microdiffusione con cella Conway, secondo quanto descritto da Mahmud *et al.* (2007). La titolazione veniva effettuata con HCl 0,01 N (Carlo Erba) con microburetta dopo incubazione a 40°C per 1 h.

Le differenze statisticamente significative tra MP e M sono state determinate mediante il test del T di Student ($P < 0,05$).

RISULTATI

I 21 campioni esaminati presentavano una lunghezza media pari a 36,57 cm ($\pm 10,03$) con lunghezza massima di 62 cm e minima di 28. Il peso medio era pari a 1200,38 g ($\pm 1143,32$) con valore massimo pari a 4300 g e minimo di 505 g.

L'andamento dei caratteri organolettici seguito in corso di conservazione permetteva di abbozzare un QIM specifico per il pesce castagna. Il QIM ottenuto presentava un range di valori che oscillavano da 0 a 15 punti di demerito (pd) e teneva in considerazione il colore della pelle (0-2 pd) e del muco (0-1 pd), l'odore della cute (0-3 pd), la forma (0-2 pd) e la limpidezza degli occhi (0-2 pd) ed infine il colore (0-2 pd) e l'odore delle branchie (0-3 pd). Il punteggio massimo veniva raggiunto a 336 ore di conservazione pari a 14 giorni.

I risultati degli andamenti degli SSOs e degli Enterobatteri totali sono riportati nelle Figure 1 e 2. Al 14° giorno di conservazione la cute dei soggetti esaminati presentava valori massimi di SSOs e di Enterobatteri pari rispettivamente a $8,7 \pm 0,2$ Log UFC/g e a $4,4 \pm 0,1$ Log UFC/g. Le branchie mostravano valori massimi pari a $7,3 \pm 0,2$ Log UFC/g per gli SSOs e di $3,2 \pm 0,7$ Log UFC/g per gli Enterobatteri. Il contenuto intestinale aveva cariche massime di alteranti pari a $5,3 \pm 0,7$ Log UFC/g con Enterobatteri al di sotto di 1 Log UFC/g. Nel caso della muscolatura gli alteranti si attestavano al valore massimo di $2,8 \pm 0,1$ Log UFC/g, mentre gli Enterobatteri erano sempre assenti.

Sempre negativa risultava la determinazione quantitativa di *Vibrio* spp. mentre dalla qualitativa si isolavano un totale di 34 ceppi che alla successiva indagine biomolecolare risultavano appartenere tutti al genere *Vibrio* poiché positivi alla ricerca del gene *rpoA*. L'identificazione di specie mediante la PCR multiplex permetteva di accertare che 33 ceppi erano *V. alginolyticus* e uno solo *V. parahaemolyticus*. Detti ceppi di *Vibrio* erano stati isolati solo da branchie e cute.

All'esame anatomico-patologico, in 3 soggetti (14,3%) si evidenziavano all'interno della camera branchiale, variamente distribuite a livello delle membrane branchiosteghe, formazioni cistiche di colorito bianco-giallastro, di dimensioni variabili, da pochi millimetri a 1,5 cm, che alla successiva

indagine allo stereomicroscopio risultavano parassiti ascrivibili alla classe dei Trematodi, famiglia *Didymozoidae*, genere *Koellikeria* specie *filicollis* (Rudolphi, 1819). In due soggetti erano in numero di 1 e 3, nel restante invece, dette formazioni erano molto più numerose, 16 a sinistra e 18 a destra.

In 15 dei 21 esemplari (71,4%) si osservavano larve di *Gymnorhynchus gigas* a livello della muscolatura. Nei soggetti di provenienza Atlantica in particolare si riscontravano in 10 dei 15 esemplari (66,6%). Il numero massimo di parassiti riscontrati era pari a 1. Nei soggetti pescati nelle acque del Mediterraneo, invece, l'incidenza saliva all'83,3% poiché 5 dei 6 soggetti risultavano infestati con un numero medio di parassiti pari a 5,6 con un massimo di 8 e un minimo di 2. L'unico non infestato era il campione che presentava le dimensioni maggiori (4,3 kg e 62 cm di lunghezza). In nessun pesce si osservano alterazioni a carico della cute né modificazioni evidenti del colore della muscolatura nemmeno se massivamente parassitato.

Dall'esame anatomico-patologico a livello della cavità celomatica si evinceva la presenza di larve la cui localizzazione, le dimensioni e l'osservazione microscopica delle caratteristiche morfologiche ci permetteva di identificarle come appartenenti al genere *Anisakis* del tipo I. Detta parassitosi si rinveniva nel 100% dei pesci castagna pescati nell'Atlantico con un numero medio di parassiti pari a $20,7 \pm 10,9$. L'incidenza diminuiva al 16,6% negli esemplari pescati nel Mediterraneo, essendo infestato un solo esemplare con 8 larve. In nessun caso si accertavano localizzazioni muscolari dei nematodi.

Infine, in tre soggetti provenienti dalla zona FAO 37, all'apertura dello stomaco, si osservava la presenza di abbondante muco biancastro in cui erano visibili da 3 a 5 parassiti mobili anch'essi biancastri delle dimensioni di 6x1 mm. Si trattava di cestodi le cui caratteristiche morfologiche e la già nota presenza nello stomaco di *B. raji* (Panbianco, 1952) li rendevano sovrapponibili a quelli descritti come *Sphiriocephalus tergestinus* (Pinter 1913). Lo mucosa gastrica dei tre esemplari era fortemente congesta e l'esame istologico rivelava una gastrite cronica d'impronta erosiva, con versamenti emorragici recenti.

L'andamento dei valori di pH in corso di conservazione non evidenziava differenze statisticamente significative tra la muscolatura parassitata e quella non parassitata.

L'andamento dell'ABVT della muscolatura del pesce castagna mostrava fino alla 144esima ora valori medi di 10mg/100g, che raggiungevano i 31,6 mg/100g alla 336esima ora (Figura 3).

La TMA-N si attestava su valori medi pari a 0,52 mg/100g sino alla 144esima ora, raggiungendo alla 336esima ora valori pari a 8,5 mg/100g (Figura 4). Il confronto dei valori di ABVT e di TMA-

N della muscolatura dei soggetti parassitati (M) rispetto a quella dei non parassitati (MP) non mostrava differenze statisticamente significative. La muscolatura parassitata evidenziava comunque valori medi quasi sempre superiori.

I valori di ABVT nelle larve di *G. gigas* in corso di conservazione erano caratterizzati da una certa variabilità, mantenendosi comunque, sempre al di sotto dei 10 mg/100g. Minore variabilità si osservava per la TMA-N che si attestava a valori massimi di 2 mg/100g.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il lavoro svolto si può, dunque, riassumere in:

- valutazioni organolettiche tese alla realizzazione di un QIM specifico per *B. raji*;
- caratterizzazione dei tenori normali di ABVT e di TMA-N con contestuale valutazione delle possibili interferenze della localizzazione muscolari di *G. gigas*;
- caratterizzazioni batteriologiche d'ordine igienico;
- osservazioni anatomo-patologiche eventualmente correlabili.

Per quanto riguarda il primo obiettivo, ci sembra di essere riusciti a individuare dei criteri ripetibili, mediante l'attribuzione di punti di demerito specifici che possono risultare utili per la realizzazione di un QIM specie-specifico.

Per quanto concerne, invece, il secondo obiettivo, a differenza di valutazioni condotte da Panebianco *et al.* (2011) in *L. caudatus*, anch'esso parassitato da *G. gigas*, non si sono rilevate differenze significative tra i tenori di ABVT e TMA-N nella muscolatura parassitata e non; ciò pur avendo accertato una quantità maggiormente elevata di entrambi i parametri nel corpo larvale. In *B. raji*, dunque, l'eventuale inconsapevole processazione di muscolatura prossima ai parassiti o contenente gli stessi non può comportare errate valutazioni della freschezza attraverso i suddetti indicatori chimici. In merito possiamo pure affermare che il QIM denuncia un'inaccettabile aspetto organolettico dei pesci quando l'ABVT e la TMA-N raggiungono, rispettivamente, valori di 31,6 mg/100g e 8,5 mg/100g, tenori questi generalmente non elevati in senso assoluto. Sotto il profilo batteriologico le contaminazioni accertate in corso di conservazione non appaiono dissimili da quelle di altre specie ittiche tenute nelle medesime condizioni; molto interessante ci sembra però segnalare, anche in questa specie ittica, la virtuale assenza dei batteri indagati in ambito intestinale così come già noto in *Centrolophus niger* (Ziino *et al.*, 2009).

La ripetitività di tale assenza ci fa ipotizzare che l'ambiente intestinale possa essere sfavorevole ad una stabile colonizzazione di tali batteri; ciò potrebbe essere correlato alla costante presenza di meduse in via di digestione, notoriamente ricche

di inibenti naturali, così come già descritto per il *C. niger*.

I nostri risultati confermano, inoltre, le frequenti presenze parassitarie di *K. filicollis* e di *S. tergestinus* già notissime come già detto in *B. raji*.

Sotto il profilo igienico-sanitario, oltre a confermare la presenza di larve di *Anisakis* nella specie considerata è importante sottolineare come i vibrioni alofili siano in essa contaminanti frequenti a livello cutaneo e branchiale; al riguardo non appare rassicurante la netta prevalenza di *V. alginolyticus* rispetto a *V. parahaemolyticus*, essendo oggi ampiamente nota la circolazione di fattori di patogenicità e documentata la responsabilità in patologie umane di origine alimentare e da contatto.

BIBLIOGRAFIA

1. Dalmasso A., La Neve F., Suffredini E., Croci L., Serracca L., Bottero M.T., Civera T. 2009. Development of a PCR Assay Targeting the *rpoA* Gene for the Screening of *Vibrio* Genus. *Food Anal. Method.* 2:317-324.
2. Di Pinto A., Ciccacese G., Tantillo G., Catalano D., Forte V.T. 2005. A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Protect.* 68:150-153.
3. Giuffrida A., Pennisi L., Bottari T., Panebianco A. 2002. Indagine sull'attività proteolitica di *Gymnorhynchus gigas* e della muscolatura infestata di *Lepidopus caudatus*. *Atti Associazione Italiana Veterinari Igienisti* 12:305-306.
4. Mahmud M.M., Hossain M.A., Ahani J., Banerjee P., Rahaman M.A. 2007. Effect of delayed icing on the quality characteristics of Bagda (*Peneus monodon* Fabricius, 1798). *Int. J. Sustain. Crop Prod.* 2:24-30.
5. Ottaviani D., Masini L., Bacchiocchi S. 2003. A biochemical protocol for the isolation and identification of current species of *Vibrio* in seafood. *J. Appl. Bacteriol.* 95:1277-1284.
6. Panebianco F. 1952. *Brama raji* (BI.). Biologia, Caratteri morfologici e strutturali, metodi di pesca, parassitosi, linea di condotta nella i. c. *Il Progresso Veterinario*. Anno VII, 8:277-281.
7. Panebianco F. 1953. *Lepidopus caudatus* (Euphr). Biologia, Caratteri morfologici e strutturali, metodi di pesca, parassitosi, linea di condotta nella i. c. *Il Progresso Veterinario*. Anno VIII, 2:65-69.
8. Panebianco A., Giuffrida A., Mancuso R. 1997. Isolamento di batteri da larve di *Gymnorhynchus gigas* (Cuvier, 1817). *Atti Società Italiana Scienze Veterinarie* 51:759-760.
9. Panebianco A., Signorino D., Muscolino D., Giarratana F. 2011. Larve plerocercoidi di *Gymnorhynchus* (Cestoda: Trypanorhyncha)

in *Lepidopus caudatus*: interferenza nella determinazione di TMA-N e AVBT. *Ital. J. Food Safety* 1:77-79.

10. Regolamento (CE) n. 2074/05 della commissione del 5 dicembre 2005 recante modalità di attuazione relative a taluni prodotti di cui al regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e all'organizzazione di controlli ufficiali a norma dei regolamenti del Parlamento europeo e del Consiglio (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004, deroga al regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e modifica dei
- regolamenti (CE) n. 853/2004 e (CE) n. 854/2004. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, L 338 del 22.12.2005.
11. Regolamento (CE) n. 2406/96 del consiglio del 26 novembre 1996 che stabilisce norme comuni di commercializzazione per taluni prodotti della pesca. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, L 334 del 23.12.1996.
12. Ziino G., Fiorini C., Giuffrida A., Panebianco A. 2009. Valutazioni d'ordine ispettivo ed igienico-sanitario su esemplari di ricciola di fondale (*Centrolophus niger*). *Rivista dell'Associazione Italiana dei Veterinari Igienisti* 6:77-80.

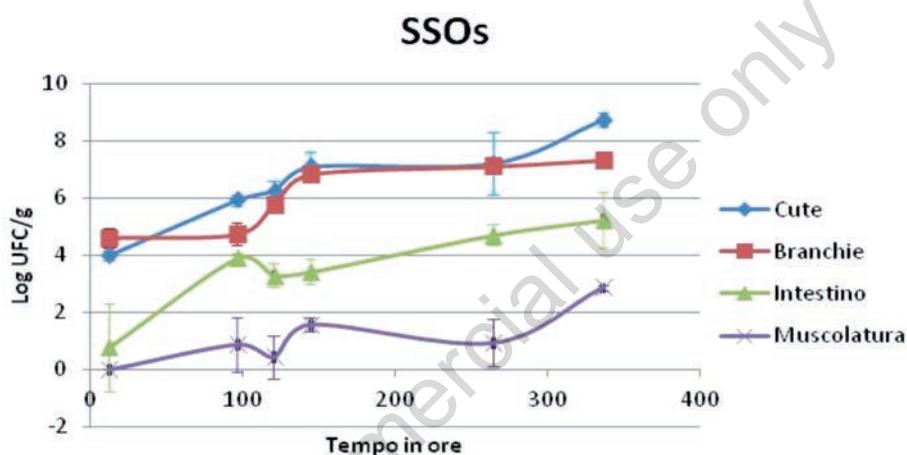


Figura 1. Andamento degli SSOs in corso di conservazione.

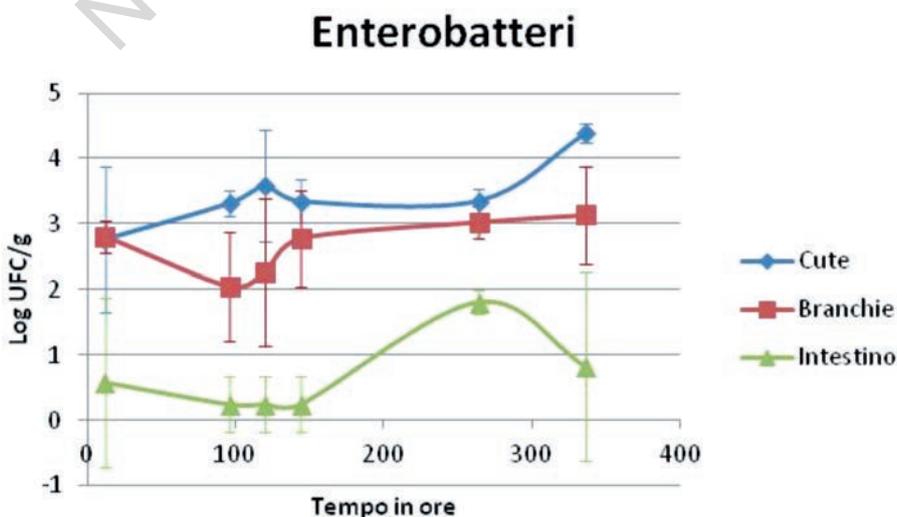


Figura 2. Andamento degli Enterobatteri in corso di conservazione.

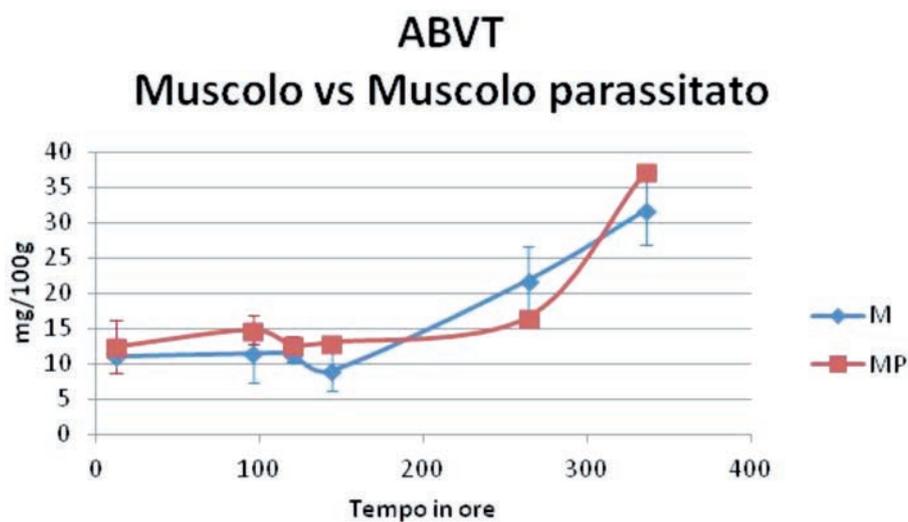


Figura 3. Andamento dell'ABVT del muscolo parassitato (MP) e di quello non parassitato (M) in corso di conservazione.

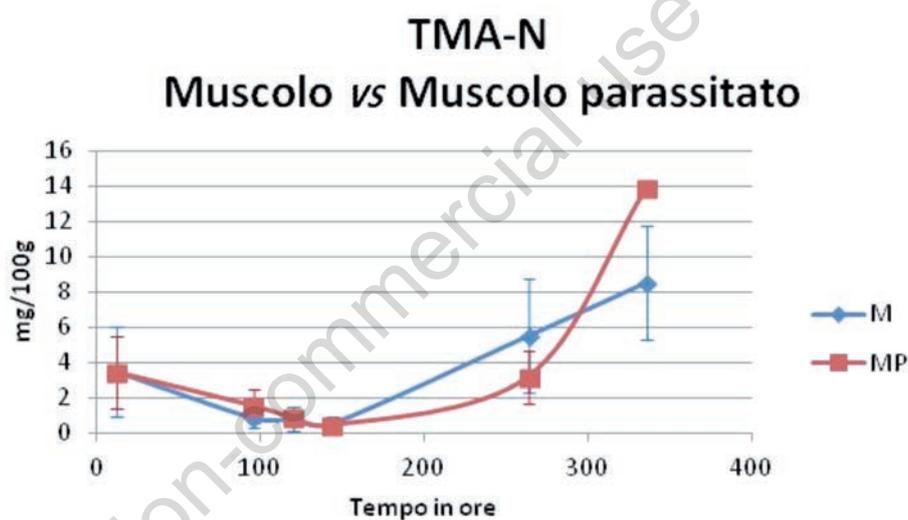


Figura 4. Andamento della TMA-N del muscolo parassitato (MP) e di quello non parassitato (M) in corso di conservazione.