



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ»



**«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΙΣΤΑΜΙΝΗΣ ΣΕ ΣΚΟΜΒΡΟΕΙΔΗ ΨΑΡΙΑ ΠΟΥ
ΠΩΛΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΓΟΡΑ ΤΗΣ ΛΑΡΙΣΑΣ»**

ΤΟΥ

ΠΑΠΠΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ του ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΥ Α.Π.Θ.

ΛΑΡΙΣΑ

Ιούνιος 2014

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Γκόβαρης Αλέξανδρος (Επιβλέπων, Καθηγητής Π.Θ.)
2. Πεξαρά Ανδρέα (Επ. Καθηγήτρια Π.Θ.)
3. Σολωμάκος Νικόλαος (Επ. Καθηγητής Π.Θ.)

Ανίχνευση ισταμίνης σε σκομβροειδή ψάρια που πωλούνται στην αγορά της Λάρισας

Περίληψη

Η δηλητηρίαση από ισταμίνη συνήθως συνδέεται με την κατανάλωση αλιευμάτων και κυρίως την κατανάλωση ψαριών της οικογένειας *Scombridae*, όπως ο τόνος, το σκουμπρί, ο κολιός κ.α. Σύμφωνα με την ετήσια συνοπτική έκθεση της Ε.Ε. του 2012 για τις τάσεις και τις αιτίες εξάρσεων κρουσμάτων τροφιμογενούς προέλευσης από τις 70 περιπτώσεις εξάρσεων κρουσμάτων όπου εμπλέκονταν ψάρια ή προϊόντα ψαριών το 48,6% είχε την ισταμίνη ως αιτιολογικό παράγοντα. Λόγω της σημασίας της ισταμίνης για την δημόσια υγεία ο Κανονισμός (Ε.Ε.) αριθ. 2073/2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα όπως τροποποιήθηκε από τον Κανονισμό (Ε.Ε.) αριθ. 1441/2007 και τον Κανονισμό (Ε.Ε.) αριθ. 1019/2013 την κατατάσσει στα κριτήρια ασφάλειας των τροφίμων θέτοντας μεταξύ άλλων τα 200mg/kg ως ανώτατο όριο παρουσίας της ισταμίνης στα αλιεύματα. Η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, F.D.A.) των Η.Π.Α. θέτει τα 50 mg/kg ως όριο παρουσίας της ισταμίνης στα βρώσιμα μέρη του ψαριού (FDA 2011).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της παρουσίας της ισταμίνης σε νωπούς κολιούς (*Scomberjaponicus colias*) που πωλούνται σε υπαίθριες αγορές της Λάρισας.

Για το σκοπό αυτό το χρονικό διάστημα από τον Ιούλιο του 2013 έως το Σεπτέμβριο του 2013 εξετάσθηκαν 50 δείγματα νωπού κολιού από την αγορά της Λάρισας. Όλα τα δείγματα αξιολογήθηκαν με βάση τα κριτήρια νωπότητας σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία και στη συνέχεια αναλύθηκαν με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA) για την παρουσία της ισταμίνης. Τα αποτελέσματα της εξέτασης έδειξαν παρουσία της ισταμίνης άνω των 50 mg/kg σε 2 δείγματα (4%) και σε ένα εξ' αυτών άνω των 100 mg/kg. Σε κανένα από τα 2 δείγματα η συγκέντρωση της ισταμίνης δεν υπερέβαινε το νομοθετικό όριο 200 mg/kg που ισχύει στην Ε.Ε. για τους ιχθύες της οικογένειας *Scombridae*.

Λέξεις - κλειδιά:

Ισταμίνη, σκομβροειδή ψάρια, νωπός κολιός, υπαίθριες αγορές, Λάρισα.

Detection of histamine in scombroid fish sold in the market of Larissa

Abstract

Histamine poisoning is usually associated with the consumption of fisheries, mainly from consumption of fish of the family Scombridae (such as tuna, mackerel). According to the annual summary report of European Union (2012) for trends and causes of foodborne outbreaks, 70 outbreaks involving fish or fish products were recorded of which 48.6% had histamine as the causative agent. Due to the importance of histamine poisoning for public health, Regulation (EU No 2073/2005) on microbiological criteria for foodstuffs, as amended by Regulation (EU No 1441/2007) and Regulation (EU No 1019/2013), has established 200 mg/kg as the limit of histamine content in fish. Other countries, such as the USA through the Food and Drug Administration (FDA), have established 50 mg/kg as the upper limit of histamine in edible parts of the fish (FDA 2011).

Aim of this work was to investigate the histamine content in fresh mackerel (*Scomber japonicus colias*) sold in street markets of Larissa.

From July 2013 to September 2013, 50 samples of fresh mackerel were purchased from street markets of Larissa. All samples were categorized using the freshness criteria according to European legislation (Regulation EU No 2406/1996) and then analyzed by enzyme immunoassay method (ELISA) for histamine content. Results showed that no sample exceeded the limit of 200 mg/ kg established by the EU for fish of the family Scombridae, while 2 samples (4%) were above 50 mg/kg.

Keywords:

Histamine, scombroid fish, fresh mackerel, street markets, Larissa.

Περιεχόμενα

| | |
|-------------------------------------|-----|
| A. Ευχαριστίες | i |
| B. Κατάσταση πινάκων | ii |
| Γ. Κατάσταση διαγραμμάτων – εικόνων | iii |

Μέρος 1^ο: Γενικό μέρος

1. Εισαγωγή

Κεφάλαιο 1

| | |
|---|----|
| 1.1 Τα ψάρια ως τρόφιμο | 1 |
| 1.1.1 Τα ψάρια στην διατροφή του ανθρώπου | 1 |
| 1.1.2 Χημική σύσταση των ψαριών | 2 |
| 1.2 Σκομβροειδείς ιχθύες και κολιός | 4 |
| 1.3 Αλλοίωση των ψαριών | 7 |
| 1.4 Συνθήκες μετά την σύλληψη και κατά την μεταφορά | 8 |
| 1.5 Κριτήρια νωπότητας αλιευμάτων | 9 |
| 1.6 Ασφάλεια ψαριών, κίνδυνοι από την κατανάλωση τους | 10 |

Κεφάλαιο 2

| | |
|---|----|
| 2. Δηλητηρίαση από ισταμίνη | 12 |
| 2.1 Βιογενείς αμίνες και ισταμίνη | 12 |
| 2.2 Σχηματισμός ισταμίνης στα ψάρια | 13 |
| 2.3 Ισταμίνη σε άλλα τρόφιμα | 14 |
| 2.4 Φυσιολογική δράση της ισταμίνης | 14 |
| 2.5 Μεταβολισμός και τοξικότητα της ισταμίνης | 16 |
| 2.6 Συμπτωματολογία και εξέλιξη | 17 |
| 2.7 Ισταμίνη στα αλιεύματα και δημόσια υγεία | 18 |
| 2.7.1 Επιδημιολογικά δεδομένα | 18 |
| 2.7.2 Νομοθεσία | 23 |
| 2.8 Μέθοδοι προσδιορισμού ισταμίνης | 24 |

| | |
|---|----|
| Μέρος 2^ο | |
| Σκοπός της εργασίας | 28 |
| | |
| 3. Μεθοδολογία | |
| 3.1 Συλλογή των δειγμάτων | 28 |
| 3.2 Προσδιορισμός ισταμίνης | 28 |
| 3.2.1. Προετοιμασία δειγμάτων και αντιδραστηρίων | 29 |
| 3.2.2. Εκτέλεση δοκιμασίας ELISA | 29 |
| 3.2.3 Υπολογισμός συγκέντρωση ισταμίνης | 30 |
| 4. Αποτελέσματα | 31 |
| 4.1 Εκτίμηση νωπότητας | 32 |
| 4.2 Αναλυτικά αποτελέσματα | 33 |
| 4.3 Συσχέτιση αποτελεσμάτων με την νωπότητα των δειγμάτων | 38 |
| 5. Συζήτηση – Συμπεράσματα | 40 |
| 6. Βιβλιογραφία | 43 |

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης και καθηγητή του τμήματος Κτηνιατρικής κ. Γκόβαρη Αλέξανδρο, για την συμβολή του στην σωστή διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής μελέτης. Θερμές ευχαριστίες στην κ. Πεζαρά Ανδρεάνα και τον κ. Σολωμάκο Νικόλαο, επίκουρους καθηγητές του τμήματος Κτηνιατρικής για την πολύτιμη βοήθεια τους καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξη της σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

B. Κατάσταση πινάκων

| | |
|--|----|
| Πίνακας 1: Εκατοστιαία σύσταση σάρκας ψαριού | 2 |
| Πίνακας 2: Αλιεία κολιού στην Ελλάδα 2000-2012 | 6 |
| Πίνακας 3: Διατροφική αξία γεύματος 100g κολιού | 7 |
| Πίνακας 4: Κριτήρια νωπότητας κυανών ψαριών | 10 |
| Πίνακας 5: Κατάταξη ειδοποιήσεων RASFF, ανά κατηγορία προϊόντος | 19 |
| Πίνακας 6: Κατάταξη ειδοποιήσεων RASFF 2003-2013, ανά είδος ειδοποίησης | 20 |
| Πίνακας 7: Τροφοδηλητηριάσεις από ισταμίνη στην Ε.Ε. το 2012 | 22 |
| Πίνακας 8: Τροφοδηλητηριάσεις από ισταμίνη στις Η.Π.Α. 2000-2011 | 23 |
| Πίνακας 9: Η ισταμίνη ως κριτήριο ασφαλείας στα αλιευτικά προϊόντα σύμφωνα με τον Κανονισμό (Ε.Ε.) αριθ. 2073/2005 | 24 |
| Πίνακας 10: Ιδιότητες των εμπορικών συσκευασιών ELISA που συγκρίθηκαν | 26 |
| Πίνακας 11: Δείγματα ψαριών | 31 |
| Πίνακας 12: Εκτίμηση της νωπότητας των δειγμάτων | 32 |
| Πίνακας 13: Συγκέντρωση ισταμίνης με βάση την πρότυπη καμπύλη (1 ^η ομάδα) | 34 |
| Πίνακας 14: Συγκέντρωση ισταμίνης με βάση την πρότυπη καμπύλη (2 ^η ομάδα) | 35 |
| Πίνακας 15: Συγκέντρωση ισταμίνης με βάση την πρότυπη καμπύλη (3 ^η ομάδα) | 37 |
| Πίνακας 16: Τελική συγκέντρωση ισταμίνης και κατάταξη νωπότητας | 37 |
| Πίνακας 17. Συγκέντρωση ισταμίνης | 39 |

Γ. Κατάσταση εικόνων - διαγραμμάτων

| | |
|--|----|
| Εικόνα 1: Εκατοστιαία συμμετοχή διαφόρων τροφίμων στην πρόσληψη εικοσιπεντανοϊκού και εικοσιδυοεξανοϊκού οξέος (Α) στην Αυστραλία (175 mg/ημέρα) και (Β) στο Ηνωμένο Βασίλειο | 2 |
| Εικόνα 2: Κατάταξη της οικογένειας <i>Scombridae</i> | 5 |
| Εικόνα 3: Κολιός (<i>Scomber japonicus</i>) | 6 |
| Εικόνα 4: Επίδραση της θερμοκρασίας στην διάρκεια συντήρησης νωπών ιχθύων | 8 |
| Εικόνα 5: Αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης σε ισταμίνη | 12 |
| Εικόνα 6: Συνοπτική παρουσίαση των επιδράσεων της ισταμίνης στον οργανισμό | 15 |
| Εικόνα 7: Έντονο ερύθημα του άνω μέρους του κορμού σε περιστατικό δηλητηρίασης από ισταμίνη | 17 |
| Εικόνα 8: Έντονο ερύθημα του άνω μέρους του κορμού και του προσώπου (αριστερά) σε περιστατικό δηλητηρίασης από ισταμίνη και πλήρης υποχώρηση των συμπτωμάτων (δεξιά) 1 ώρα μετά την εμφάνιση τους χωρίς θεραπεία | 18 |
| | |
| Διάγραμμα 1: Κατάταξη ειδοποιήσεων RASFF, ανά κατηγορία προϊόντος | 20 |
| Διάγραμμα 2: Κατάταξη ειδοποιήσεων RASFF, ανά είδος ειδοποίησης | 21 |
| Διάγραμμα 3: Κατανομή των εξάρσεων κρουσμάτων τροφοδηλητηρίασης στην Ε.Ε λόγω κατανάλωσης ψαριών ή των προϊόντων τους ανά αιτιολογικό παράγοντα | 23 |
| Διάγραμμα 4: Πρότυπη καμπύλη 1ης ομάδας δειγμάτων | 34 |
| Διάγραμμα 5: Πρότυπη καμπύλη 2ης ομάδας δειγμάτων | 35 |
| Διάγραμμα 6: Πρότυπη καμπύλη 3ης ομάδας δειγμάτων | 36 |

ΜΕΡΟΣ 1^ο

Γενικό μέρος

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Τα ψάρια ως τρόφιμο

1.1.1 Τα ψάρια στην διατροφή του ανθρώπου

Η παγκόσμια παραγωγή ψαριών (αλιεία και ιχθυοκαλλιέργειες) έχει σημαντική συμβολή στο παγκόσμιο εμπόριο και την διατροφή του ανθρώπου, με μια μέση κατανάλωση ανά κάτοικο 18,6 kg το 2010. Από τα 148 εκατ. τόνους της παγκόσμιας παραγωγής το 2010 (συνολικής αξίας 158 δις €) τα 128 εκατ. τόνους προορίζονταν για ανθρώπινη κατανάλωση. Το 47% της παραπάνω ποσότητας προήλθε από ιχθυοκαλλιέργειες ποσοστό που αναμένεται να ανέλθει στο 60% ως το 2020 (Ababouch 2014).

Η κατανάλωση θαλασσιών ψαριών στην Ελλάδα ανέρχεται, σύμφωνα με τα στοιχεία του FAOSTAT για το 2009, στα 12,4 κιλά/κάτοικο/έτος. Βρίσκεται κοντά στο μέσο όρο των χωρών της Ευρώπης ο οποίος κυμαίνεται στα 13,7 kg/κάτοικο/έτος βαίνοντας μειούμενος σε σχέση με τα 15,8 kg/κάτοικο του έτους 2000. Πρέπει να επισημανθεί ότι σε άλλες χώρες της Μεσογείου, όπως η Ισπανία και η Πορτογαλία η κατανάλωση ανά κάτοικο είναι διπλάσια έως τριπλάσια σε σχέση με την Ελλάδα (FAOSTAT 2013).

Τα ψάρια είναι μια ευρύτατα διαθέσιμη, υψηλής διατροφικής αξίας τροφή αφού είναι πλούσια σε υψηλής ποιότητας πρωτεΐνες, και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και φτωχά σε κορεσμένα λιπαρά. Οι έρευνες των τελευταίων ετών δείχνουν ότι προκύπτουν σημαντικά οφέλη υγείας από την κατανάλωση αλιευμάτων. Ενδεικτικά αναφέρονται η μείωση του κινδύνου στεφανιαίας νόσου και η καλύτερη ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και της όρασης στα παιδιά (Institute Of Medicine 2006).

Τα ω-3 λιπαρά οξέα έχει αποδειχθεί από επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες ότι μειώνουν την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Ευρείας κλίμακας επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι άτομα με κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου ωφελούνται από την κατανάλωση ω-3 λιπαρών οξέων με προέλευση τα φυτά ή τα ψάρια αν και οι ιδανικές δόσεις δεν έχουν καθοριστεί. Ευρήματα μελετών δείχνουν ότι ημερήσια πρόσληψη 0,5-1g εικοσιπεντανοϊκού (EPA) και εικοσιδυοεξανοϊκού οξέος (DHA)

μειώνει την θνησιμότητα από καρδιακά αλλά και άλλα νοσήματα (Kris-Etherton et al 2002).

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 1, η προέλευση των ω-3 λιπαρών οξέων (EPA+DHA) διαφέρει από χώρα σε χώρα ανάλογα με τις διατροφικές συνήθειες. Σε κάθε περίπτωση πάντως η συμβολή των ψαριών στην πρόσληψη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (με κυρίαρχα τα λιπαρά ψάρια όπως η σαρδέλα, το σκουμπρί, ο κολιός) είναι πολλαπλάσια όλων των υπολοίπων ειδών τροφίμων.



Εικόνα 1. Εκατοστιαία συμμετοχή διαφόρων τροφίμων στην πρόσληψη εικοσιπεντανοϊκού και εικοσιδυοεξανοϊκού οξέος (A) στην Αυστραλία (175 mg/ημέρα) και (B) στο Ηνωμένο Βασίλειο (244 mg/ημέρα) (adapted from De Smet 2012)

1.1.2 Χημική σύσταση των ψαριών

Η χημική σύσταση των ψαριών διαφέρει σημαντικά τόσο από είδος σε είδος όσο και μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους ανάλογα με την ηλικία, το φύλο, το περιβάλλον και την εποχή του έτους. Μια συνοπτική εικόνα των κυριότερων συστατικών των ψαριών δίνεται στον πίνακα 1 (FAO 1995).

Πίνακας 1. Εκατοστιαία σύσταση σάρκας ψαριού (Πηγή: FAO 1995).

| Συστατικό | Εκατοστιαία σύσταση σάρκας ψαριού | | |
|--------------|-----------------------------------|---------------------|---------|
| | Ελάχιστο | Κανονική διακύμανση | Μέγιστο |
| Πρωτεΐνες | 6 | 16-21 | 28 |
| Λίπη | 0,1 | 0,2-25 | 67 |
| Υδατάνθρακες | | <0,5 | |
| Τέφρα | 0,4 | 1,2-1,5 | 105 |
| Νερό | 28 | 66-81 | 96 |

- **Νερό**

Το κυριότερο συστατικό της σάρκας των ψαριών είναι το νερό αφού ανέρχεται στο 80% του συνολικού βάρους της σάρκας στα λευκόσαρκα ψάρια και στο 70% του συνολικού βάρους της σάρκας στα σκοτεινόσαρκα λιπαρά ψάρια. Το νερό στην σάρκα των φρέσκων ψαριών είναι στενά συνδεδεμένο με τις πρωτεΐνες με τέτοιο τρόπο ώστε δύσκολα εξέρχεται ακόμα και με άσκηση υψηλής πίεσης. Στα ζωντανά ψάρια η ποσότητα του νερού αυξάνεται και αυτή των πρωτεϊνών μειώνεται όταν πλησιάζει η περίοδος της ωοτοκίας (FAO 2001).

- **Λίπη**

Η περιεκτικότητα των ψαριών σε λίπος διαφέρει σημαντικά από είδος σε είδος. Γενικά, θεωρείται ότι τα ψάρια με ανοιχτόχρωμη σάρκα (μπακαλιάρος) έχουν μικρή περιεκτικότητα σε λίπος, ενώ αυτά με σκοτεινόχρωμη σάρκα (σολομός, ρέγγα, σκουμπρί) μεγάλη περιεκτικότητα. Αντίστοιχα, μεγαλύτερη είναι και η περιεκτικότητα σε ω-3 λιπαρά οξέα. Στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των ψαριών κυριαρχούν το εικοσιπεντανοϊκό (C20:5 n-3 ή EPA) και εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ (C22:6 n-3 ή DHA). Η εποχή του έτους, η επάρκεια τροφής και η ωοτοκία είναι παράγοντες που επηρεάζουν την λιποπεριεκτικότητα της σάρκας των ψαριών (Argino et al 2005).

- **Πρωτεΐνες**

Οι πρωτεΐνες της σάρκας των ψαριών διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: α) δομικές πρωτεΐνες (ακτίνη, μυοσίνη, ακτομυοσίνη, τροπομυοσίνη) που αποτελούν το 70-80% των συνολικών πρωτεϊνών β) σαρκοπλασματικές πρωτεΐνες (μυοαλβουμίνη, γλοβουλίνη και ένζυμα) που αποτελούν το 25-30% των συνολικών πρωτεϊνών και γ) πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού (κολλαγόνο) που αποτελούν το 3-10% των συνολικών πρωτεϊνών (FAO 1995). Αμινοξέα όπως η λυσίνη και η μεθειονίνη ανευρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (FAO 2001).

- **Μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ενώσεις**

Περιλαμβάνουν ενώσεις όπως τα ελεύθερα αμινοξέα, πεπτίδια, αμίνες και τα οξειδία τους κλπ. Ανάμεσα τους ξεχωρίζουν το οξειδίο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) μία άχρωμη, άοσμη και χωρίς γεύση ουσία, η οποία όμως καταβολίζεται ενζυμικά σε τριμεθυλαμίνη. Αποτέλεσμα είναι η δυσάρεστη οσμή και η υποβάθμιση της ποιότητας. Από τα ελεύθερα αμινοξέα ξεχωρίζει η ιστιδίνη η οποία σε σκοτεινόσαρκα λιπαρά ψάρια όπως τα σκομβροειδή (αλλά και σε άλλα είδη) φτάνει σε ποσοστό 1%. Ο μικροβιακός καταβολισμός της ιστιδίνης σε ισταμίνη, η οποία είναι θερμοανθεκτική και δε διασπάται με το μαγείρεμα, αποτελεί κίνδυνο για την δημόσια υγεία (Argino et al 2005).

- **Υδατάνθρακες**

Η ποσότητα των υδατανθράκων στα λευκόσαρκα ψάρια είναι πολύ χαμηλή για τις διατροφικές ανάγκες του ανθρώπου. Συνήθως κυμαίνεται κάτω από 1% ενώ στα σκοτεινόσαρκα λιπαρά ψάρια αγγίζει και το 2% (FAO 2001).

- **Βιταμίνες και Ιχνοστοιχεία**

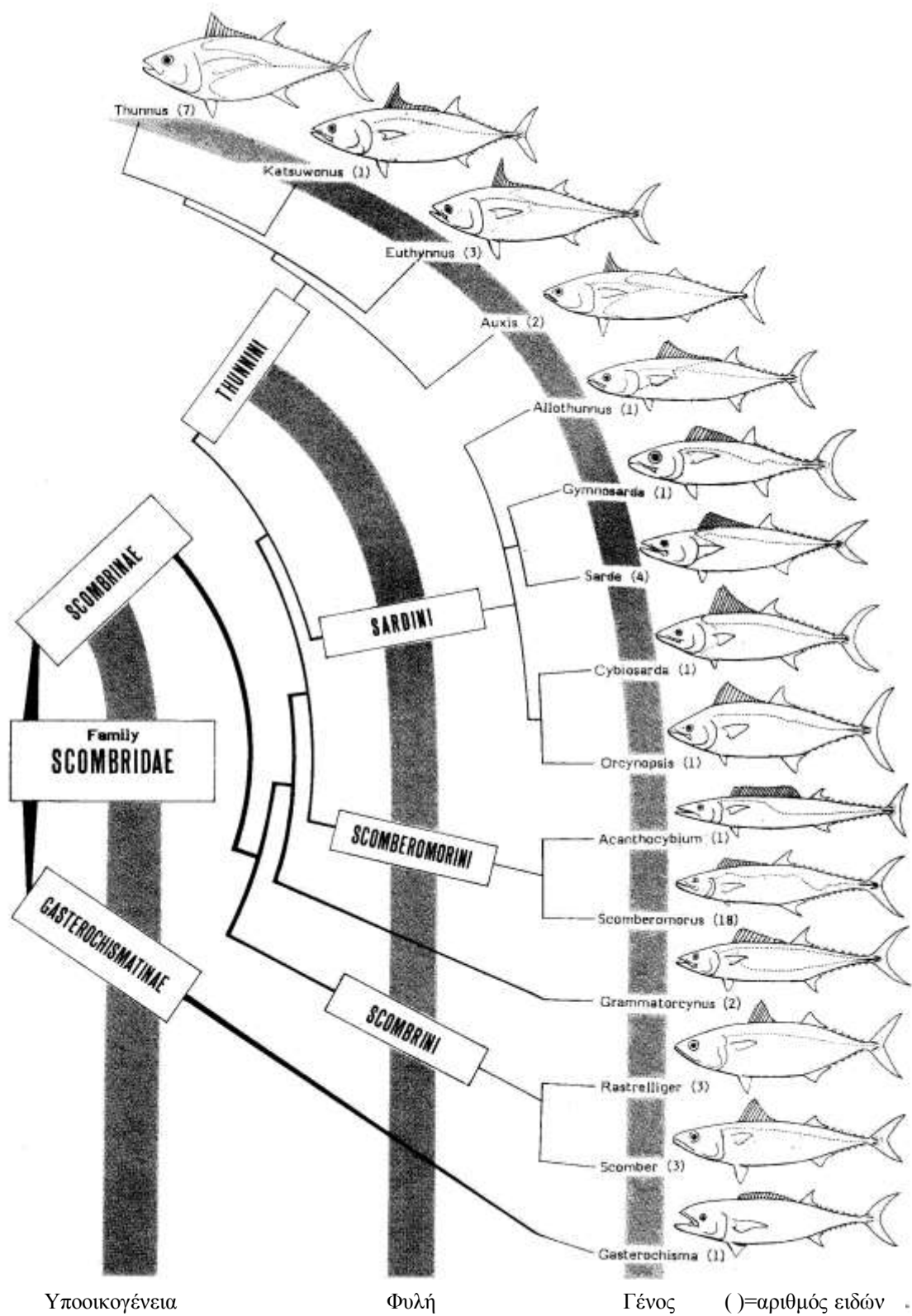
Η περιεκτικότητα της σάρκας των ψαριών σε βιταμίνες και ιχνοστοιχεία διαφέρει ανάλογα με το είδος και την εποχή του έτους. Τα ψάρια είναι γενικά καλή πηγή βιταμινών του συμπλέγματος Β, και στην περίπτωση των λιπαρών ψαριών και των βιταμινών Α και D. Σε ότι αφορά τα ιχνοστοιχεία η σάρκα των ψαριών θεωρείται

πολύτιμη πηγή ασβεστίου και φωσφόρου αλλά και σιδήρου, χαλκού και σεληνίου. Τα ψάρια της θάλασσας είναι επίσης πλούσια και σε ιώδιο (FAO 1995).

1.2 Σκομβροειδείς ιχθύες και κολιός

Η οικογένεια *Scombridae* είναι η μεγαλύτερη από τις τέσσερις οικογένειες των σκομβροειδών ψαριών. Περιλαμβάνει 15 γένη (εικόνα 2) και 51 είδη. Από αυτά τα 50 ανήκουν στην υποοικογένεια *Scombrinae* και μόνο ένα στην υποοικογένεια *Gasterochismatinae*. Ψάρια της οικογένειας αυτής όπως τα διάφορα είδη τόνου, το σκουμπρί, ο κολιός και η παλαμίδα είναι γνωστά εδώδιμα είδη που αποτελούν σημαντικό κομμάτι τόσο της επαγγελματικής όσο και της ερασιτεχνικής αλιείας σε θάλασσες των τροπικών και εύκρατων ζωνών. Η αλιεία τους σε ψυχρές και εύκρατες θάλασσες υπερέχει αυτής σε τροπικές. Πάνω από τη μισή ποσότητα της παγκόσμιας αλιείας λαμβάνει χώρα στον βορειοδυτικό και νοτιοανατολικό Ειρηνικό Ωκεανό και στον βορειοανατολικό Ατλαντικό (Collette 2003).

Τα ψάρια της οικογένειας των σκομβροειδών σχετίζονται περισσότερο από κάθε άλλο νωπό τρόφιμο, με περιστατικά δηλητηρίασης από ισταμίνη λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε ελεύθερη ιστιδίνη. Η ιστιδίνη καταβολίζεται είτε με απαμίνωση προς ουροκανικό οξύ, είτε με αποκαρβοξυλίωση προς ισταμίνη. Υπό φυσιολογικές συνθήκες επικρατεί η πρώτη οδός, σε περίπτωση όμως κακών συνθηκών συντήρησης και μικροβιακής ανάπτυξης σχηματίζεται ισταμίνη (Silla-Santos 1996). Τα εμπορεύσιμα είδη ψαριών της οικογένειας *Scombridae* στην Ελλάδα είναι το σκουμπρί (*Scomber scomber*) ο κολιός (*Scomber japonicus colias*), η παλαμίδα (*Sarda sarda*) και ο τόνος (*Thynnus thynnus*) (Βαρελτζής 1999).



Εικόνα 2. Κατάταξη της οικογένειας *Scombridae* (Πηγή: FAO 1983)

Ο κολιός (*Scomber japonicus*) είναι ένα κοσμοπολίτικο, μεσαίου μεγέθους πελαγικό είδος με ευρεία διάδοση στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές του Ατλαντικού, Ινδικού και Ειρηνικού ωκεανού αλλά και των γειτονικών θαλασσών τους όπως η Μεσόγειος. Θεωρείται παράκτιο είδος που ανευρίσκεται από την επιφάνεια της θάλασσας έως και βάθος 300 μέτρων (FAO 2014). Το σώμα του κολιού (εικόνα 3) λεπταίνει και στα δύο άκρα. Έχει ένα μυτερό κεφάλι και μεγάλο στόμα. Το κεφάλι είναι σκούρο μπλε, το πίσω μέρος είναι σκούρο μπλε με περίπου 30 σκοτεινό κυματιστές γραμμές, και η κάτω πλευρά είναι ασημί πράσινη (fishwatch.gov 2014). Το μέγιστο μήκος του φτάνει τα 50 cm με μέσο μήκος τα 30 cm (FAO 2014).

Είναι μεταναστευτικό είδος, το οποίο σχηματίζει πολυπληθή κοπάδια από ισομεγέθη ψάρια. Τρέφεται με μικρότερα είδη πελαγικών ψαριών, καθώς και πελαγικά ασπόνδυλα. Αναπαράγεται κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, κυρίως τον Αύγουστο. Ο κολιός αλιεύεται, κυρίως, με στατικά δίχτυα και τράτες βυθού, καθώς και με ψιλές συρτές, καθετές και τσαπαρί. Αν και το κρέας του είναι σχετικά καλής ποιότητας και πολύ ωφέλιμο, δεν έχει μεγάλη εμπορική αξία. Οι ευρωπαϊκοί κανονισμοί ορίζουν ως ελάχιστο μέγεθος (ολικό μήκος) αλιείας του κολιού στη Μεσόγειο τα 18 εκατοστά (Υπουργείο Γεωργίας Κύπρου 2011).



Εικόνα 3. Κολιός (*Scomber japonicus*) (Πηγή: fishwatch.gov 2014).

Η αλιεία του κολιού σε παγκόσμιο επίπεδο κυμαίνεται από το 1970 έως σήμερα σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία του FAO σε περίπου 2.000.000 τόνους ετησίως. Μόνη εξαίρεση η τετραετία 1977-1980 που έφτασε και ξεπέρασε τα 3.000.000 τόνους. Οι ποσότητες που αλιεύονται στα Ελληνικά ύδατα κυμαίνονται την τελευταία δεκαετία στους 2.000 – 3.000 τόνους (4% επί του συνόλου) όπως φαίνεται στον πίνακα 2 ενώ την δεκαετία του 1990 ξεπερνούσαν σταθερά τους 4.000 τόνους έχοντας αγγίξει τους 14.000 τόνους το 1994 (FAO 2014).

Πίνακας 2. Αλιεία κολιού στην Ελλάδα 2000-2012 (Πηγή: FAO 2014).

| Ποσότητες κολιού σε τόνους που αλιεύτηκαν στην Ελλάδα κατά τα έτη 2000-2012 | | | | | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 |
| 2.286 | 1.829 | 3.188 | 2.786 | 2.937 | 3.473 | 3.277 | 3.017 | 1.980 | 2.097 | 2.783 | 1.975 | 1.850 |

Ο κολιός ως τρόφιμο είναι μια πολύ καλή πηγή πρωτεϊνών, ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, νιασίνης, βιταμίνης B₁₂ και σεληνίου. Η διατροφική του αξία ανά 100 g γεύματος εμφανίζεται στον πίνακα 3. Αποτελεί ένα από τα πιο συνηθισμένα ψάρια που διακινούνται νωπά μέσω ιχθυοπωλείων και υπαίθριων αγορών τους θερινούς μήνες στην Ελλάδα.

Πίνακας 3 Διατροφική αξία γεύματος 100 g κολιού (Πηγή: fishwatch.gov 2014).

| Διατροφική αξία ανά 100 g κολιού | |
|----------------------------------|---------|
| Θερμίδες | 158 |
| Πρωτεΐνες | 20,07g |
| Ολικά λιπαρά | 7,89g |
| Κορεσμένα λιπαρά | 2,25g |
| Υδατάνθρακες | 0g |
| Σάκχαρα | 0g |
| Χοληστερόλη | 47mg |
| Σελήνιο | 36,5mcg |
| Νάτριο | 86mg |

1.3 Αλλοίωση των ψαριών

Το κρέας των ψαριών είναι από τα πιο ευαλλοιώτα τρόφιμα. Παράγοντες που ευνοούν την αλλοίωση είναι:

- Τα βακτήρια που αποικίζουν το δέρμα των ψαριών.
- Το δέρμα παραμένει υγρό ευνοώντας την ανάπτυξη των βακτηρίων που στην συνέχεια εισχωρούν στη σάρκα.
- Τα ψάρια δεν εκσπλαχνίζονται ή εκσπλαχνίζονται όψιμα με αποτέλεσμα βακτήρια του πεπτικού σωλήνα να εισχωρούν στη σάρκα.
- Η τιμή του pH της σάρκας των ψαριών είναι υψηλή (pH >6) (χαμηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες) και ευνοεί την ανάπτυξη των βακτηρίων.
- Η σάρκα τους είναι πλούσια σε ελεύθερα αμινοξέα τα οποία μεταβολίζονται εύκολα από τα βακτήρια και παράγουν αζωτούχες πτητικές ουσίες όπως η τριμεθυλαμίνη (Πεξάρá 2013).

Η αλλοίωση των ψαριών οφείλεται σε μηχανισμούς ενζυμικής, οξειδωτικής και βακτηριακής φύσης:

- Πρωτεολυτικά κυρίως, ένζυμα που είτε προϋπάρχουν στην σάρκα των ψαριών είτε παράγονται από τα βακτήρια.
- Οξείδωση των ακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των ψαριών, ειδικά των λεγόμενων λιπαρών ψαριών (σκουμπρί, κολιός, ρέγγα) (Ghaly et al 2010).
- Τα κυριότερα βακτήρια που προκαλούν αλλοίωση των ψαριών ανήκουν στα είδη *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Shewanella*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*. Τα βακτήρια ανευρίσκονται σε μεγάλους αριθμούς σε όλες τις εξωτερικές επιφάνειες και τον πεπτικό σωλήνα των ψαριών. Το

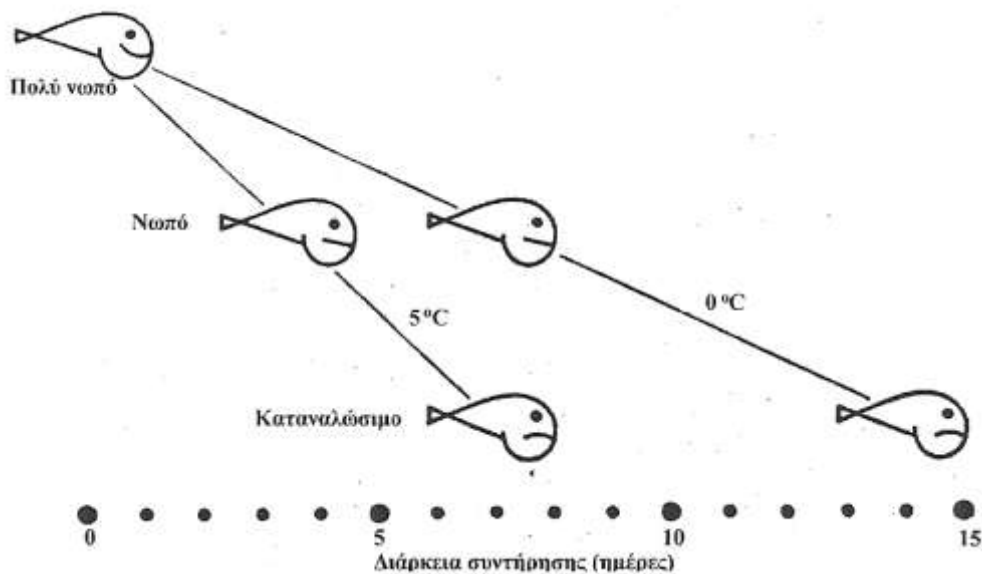
δέρμα περιέχει από 10^2 - 10^6 cfu/cm², ενώ τα βράγχια και το έντερο 10^2 - 10^6 cfu/g. Η σάρκα είναι στείρα κατά την σύλληψη των ψαριών αλλά επιμολύνεται εύκολα από τα βακτήρια του δέρματος και του εντέρου εξαιτίας κακής συντήρησης ή χειρισμών (Sivertsvik et al 2002).

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη συντήρηση των ψαριών υπό ψύξη είναι :

1. Το είδος,
2. Η λιποπεριεκτικότητα της σάρκας τους,
3. Το περιβάλλον το οποίο ζουν,
4. Η μέθοδος αλιείας,
5. Οι χειρισμοί τους μετά τη σύλληψη τους και
6. Η μέθοδος συντήρησης τους (Βαρελτζής 1999).

1.4 Συνθήκες μετά την σύλληψη και κατά την μεταφορά

Τα αλιεύματα είναι προϊόντα που αλλοιώνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα ακόμα και όταν συντηρούνται υπό ψύξη. Η υποβάθμιση της ποιότητας τους αρχίζει αμέσως μετά την σύλληψη τους και οφείλεται αρχικά στην δράση ενδογενών ενζύμων του πεπτικού σωλήνα και της σάρκας τους. Ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός μικροοργανισμών του δέρματος και του πεπτικού τους σωλήνα και η προσβολή της σάρκας τους σε δεύτερο στάδιο. Η υποβάθμιση της ποιότητας των νωπών ψαριών εξαρτάται κυρίως από την θερμοκρασία συντήρησης (εικόνα 4) (Βαρελτζής 1999).



Εικόνα 4. Επίδραση της θερμοκρασίας στην διάρκεια συντήρησης νωπών ιχθύων (Πηγή: Βαρελτζής 1999).

Για τα είδη ψαριών όπως τα σκομβροειδή που είναι επιρρεπή στον σχηματισμό ισταμίνης στη σάρκα τους ο έλεγχος του χρόνου και της θερμοκρασίας είναι ίσως ο μοναδικός τρόπος να διασφαλιστεί η ασφάλεια τους (Codex Alimentarius 2009).

Η αλυσίδα ψύξης των νωπών ψαριών ξεκινά από την στιγμή της αλίευσης τους. Μετά το ξέπλυμα τους με πόσιμο ή καθαρό θαλασσινό νερό πρέπει να τοποθετούνται χωρίς καθυστέρηση σε κατάλληλους καθαρούς περιέκτες με καθαρό πάγο σε αναλογία δύο κιλά αλιευμάτων προς ένα κιλό πάγου ώστε η θερμοκρασία τους να προσεγγίζει τους 0°C. Ο πάγος πρέπει να βρίσκεται ομοιόμορφα κατανεμημένος στους περιέκτες ώστε όλα τα στρώματα των ψαριών να ψύχονται ικανοποιητικά (Codex Alimentarius 2009). Οι περιέκτες πρέπει να έχουν σύστημα αποστράγγισης του νερού που προκύπτει από το λιώσιμο του πάγου (Υπουργείο Γεωργίας Κύπρου 2009).

Η εκφόρτωση των αλιευμάτων και η μεταφορά τους στην ιχθυόσκαλα πρέπει να γίνεται χωρίς καθυστερήσεις και η αποθήκευση τους να γίνεται σε προστατευμένους χώρους με κατάλληλη θερμοκρασία (Υπουργείο Γεωργίας Κύπρου 2009). Η μεταφορά τους προς τους χώρους λιανικής πώλησης γίνεται με κατάλληλα οχήματα ώστε η θερμοκρασία τους να προσεγγίζει τους 0 °C. Στις υπαίθριες αγορές τα νωπά αλιεύματα πρέπει να συντηρούνται στην θερμοκρασία τήξης του πάγου. Η συντήρηση των αλιευμάτων γίνεται σε καθαρό πάγο σε αναλογία 2 kg αλιευμάτων προς 1 kg πάγου. Ο πάγος πρέπει να παρασκευάζεται από νερό που πληροί τα κριτήρια του πόσιμου και να διακινείται κάτω από υγιεινές συνθήκες. Οι περιέκτες που χρησιμοποιούνται για την έκθεση των αλιευμάτων πρέπει να είναι μιας χρήσεως, από κατάλληλο υλικό για τρόφιμα (φελιζόλ, ξύλο), είτε από ειδικό πλαστικό για τρόφιμα πολλαπλών χρήσεων. Πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφεύγεται η δημιουργία εξωτερικών τραυματισμών στα προς πώληση αλιεύματα διότι αυτοί αποτελούν εστίες ανάπτυξης μικροοργανισμών (ΕΦΕΤ 2002).

Ο μέγιστος χρόνος συντήρησης των αλιευμάτων υπό ψύξη εξαρτάται από το είδος και από το περιβάλλον στο οποίο ζουν. Ψάρια που αλιεύονται από θερμά νερά συντηρούνται περισσότερο χρόνο σε σχέση με αυτά των ψυχρών νερών. Τα λευκόσαρκα ψάρια που αλιεύτηκαν σε δροσερά νερά θεωρούνται υψηλής ποιότητας για 3-4 ημέρες και μπορούν να καταναλωθούν για 12-18 ημέρες. Αντίθετα τα σκοτεινόσαρκα ή κυανά ψάρια υψηλής λιποπεριεκτικότητας θεωρούνται υψηλής ποιότητας για 1-1,5 ημέρες και μπορούν να καταναλωθούν για 4-6 ημέρες (Βαρελτζής 1999).

1.5 Κριτήρια νωπότητας αλιευμάτων

Ο Κανονισμός (Ε.Ε.) αριθ. 2406/1996, περί καθορισμού κοινών προδιαγραφών εμπορίας ορισμένων αλιευτικών προϊόντων όπως τροποποιήθηκε και ισχύει καθορίζει μεταξύ των άλλων κριτήρια φρεσκότητας για τα κυανά ψάρια. Αυτά περιλαμβάνουν την κατάσταση του δέρματος, της δερματικής βλέννας, της υφής της σάρκας, των οφθαλμών, των βραγχίων και των καλυμμάτων και της οσμής των βραγχίων. Με βάση αυτά τα κριτήρια που αναλύονται στο παράρτημα I του Κανονισμού (πίνακας 4) τα κυανά ψάρια κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες. Τρεις κατηγορίες φρεσκότητας: Εξαιρετικό, Α και Β και στην κατηγορία απαράδεκτα.

Η νοπότητα των αλιευμάτων εκτιμάται κυρίως οπτικώς, χρησιμοποιούνται επίσης όταν είναι αναγκαίο οι αισθήσεις της αφής και της όσφρησης. Στην κατηγορία εξαιρετικό κατατάσσονται τα νωπά αλιεύματα αμέσως μετά της αλίευση τους ενώ αλιεύματα που κατατάσσονται στην κατηγορία απαράδεκτο θεωρούνται ακατάλληλα για κατανάλωση ή περαιτέρω επεξεργασία (Υπουργείο Γεωργίας Κύπρου 2009).

Πίνακας 4. Κριτήρια νοπότητας κυανών ψαριών [Κανονισμός (Ε.Ε.) αριθ. 2406/1996].

| | Κατηγορία φρεσκότητας | | | |
|--------------------|--|---|--|---|
| | Εξαιρετικό | A | B | Απαράδεκτο |
| Δέρμα | Ζωηρός χρωματισμός, ζωηρά, ιριδίζοντα χρώματα σαφής διαφορά μεταξύ ραχιαίας και κοιλιακής επιφάνειας | Απώλεια λάμψης και στιλπνότητας· μικρότερη διαφορά μεταξύ της ραχιαίας και της κοιλιακής επιφάνειας | Χρώματα θαμπά, χωρίς λάμψη, άτονα· κατά την κύρτωση του ψαριού, το δέρμα ρυτιδώνεται | Πολύ θαμπός χρωματισμός το δέρμα αποσπάται από τη σάρκα ή σε πιο προχωρημένο στάδιο αποσύνθεσης |
| Δερματική βλέννα | Υδαρής, διαυγής | Ελαφρώς θολή | Γαλακτόχρωμη | Κιτρινωπή, γκρίζα, αδιαφανής βλέννα ή σε πιο προχωρημένο στάδιο αποσύνθεσης |
| Υφή της σάρκας | Πολύ ανθεκτική, σκληρή | Αρκετά σκληρή, ανθεκτική | Ελαφρώς μαλακή | Μαλακή (πλαδαρή) ή σε πιο προχωρημένο στάδιο αποσύνθεσης |
| Καλύμματα βραγχίων | Αργυρόχρωμα | Αργυρόχρωμα, ελαφρώς ερυθρά ή καστανόχρωμα | Καστανόχρωμα με έντονες εκχυμώσεις αίματος από τα αγγεία | Κιτρινωπά ή σε πιο προχωρημένο στάδιο αποσύνθεσης |
| Οφθαλμός | Κυρτός προεξέχων κόρη κυανόμαυρη, στιλπνή, «βλέφαρο» διαφανές | Κυρτός και ελαφρώς βυθισμένος, -κόρη σκοτεινόχρωμη ελαφρώς οπαλίζων κερατοειδής | Επίπεδος· ασαφής κόρη· εκχυμώσεις αίματος γύρω από τον οφθαλμό | Κοίλος στο κέντρο γκρίζα κόρη γαλακτόχρωμος κερατοειδής ή σε πιο προχωρημένο στάδιο αποσύνθεσης |
| Βράγχια | Ομοιόμορφο σκοτεινό ερυθρό έως ιώδες χρώμα. Έλλειψη βλέννης | Χρώμα λιγότερο ζωηρό, πιο άτονο στις άκρες. Βλέννα διαφανής | Βλέννα παχεία, αποχρωματισμένη, αδιαφανής | Κιτρινωπά γαλακτόχρωμη βλέννα ή σε πιο προχωρημένο στάδιο αποσύνθεσης |
| Οσμή βραγχίων | Οσμή φρέσκων φυκών· έντονη· ιωδιούχος | Έλλειψη οσμής φυκών. Ουδέτερη οσμή | Ελαφρώς θειούχος λιπαρή οσμή που θυμίζει ταγγισμένο μπέικον ή σάπια φρούτα | Σάπια ξνίλα ή σε πιο προχωρημένο στάδιο αποσύνθεσης |

1.6 Ασφάλεια ψαριών-κίνδυνοι από την κατανάλωση τους

Όπως όλα τα τρόφιμα ζωικής προελεύσεως έτσι και τα ψάρια είναι δυνατόν να κρύβουν κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών. Η ρύπανση των θαλασσών, η μη τήρηση των κανόνων υγιεινής και η ανεπαρκής ή καθυστερημένη ψύξη των αλιευμάτων αποτέλεσαν συχνά τις αιτίες για τροφιμογενείς ασθένειες. Οι κυριότεροι κίνδυνοι που επιφυλάσσει η κατανάλωση ψαριών διακρίνονται σε βιολογικούς (βακτήρια, παράσιτα, βιοτοξίνες) και χημικούς (υδράργυρος, μόλυβδος, διοξίνες) (Ababouch 2014).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα ψάρια είναι ιδιαίτερα ευπαθή τρόφιμα. Έτσι εκτός από αλλοιογόνους μικροοργανισμούς εύκολα αναπτύσσονται στην σάρκα τους και παθογόνοι μικροοργανισμοί. Τα κυριότερα παθογόνα βακτήρια παρόντα στο υδάτινο περιβάλλον και την μικροχλωρίδα των ψαριών (κυρίως έντερο και δέρμα) είναι τα: *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas spp* και *Clostridium botulinum* (De Paola & Toyofuku 2014). Επιμόλυνση με παθογόνα όπως *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* μπορεί να συμβεί λόγω κακών χειρισμών κατά την αλίευση, τον εκσπλαχνισμό ή την μεταφορά των ψαριών. Μπορεί επίσης να είναι αποτέλεσμα της χρήσης μολυσμένου νερού ή πάγου για το πλύσιμο και την συντήρησή τους. Συνήθως το αρχικό μικροβιακό φορτίο είναι μικρό και η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε επίπεδο που μπορεί να προκαλέσει τροφιογενή νόσο συνδέεται με μη καλές συνθήκες συντήρησης και ιδιαίτερα ανεπαρκούς ή καθυστερημένης ψύξης (Ababouch 2014).

Τα πιο σημαντικά παράσιτα των ψαριών είναι τα νηματώδη. Το *Photocanema decipiens* βρίσκεται κυρίως στην κοιλιακή περιοχή και σε φιλέτα ψαριών ενώ τα είδη *Anisakis* βρίσκονται κυρίως σε κοιλότητες του σώματος τους. Το *Anisakis lavrae* είναι ανθεκτικό στην κάπνιση αλλά σχετικά ευαίσθητο στην θέρμανση και την κατάψυξη (Αρβανιτογιάννης και συν. 2001). Τρηματώδη παράσιτα των ειδών *Opisthorchis*, *Clonorchis*, μπορούν να μεταδοθούν με την κατανάλωση ωμών ή ατελώς ψημένων ψαριών του γλυκού νερού. Το ίδιο ισχύει και για το κεστώδες *Diphyllobothrium latum*. Τα τρηματώδη *Heterophyes heterophyes*, *Metagonimus yokogawai* και *Echinostoma spp* μεταδίδονται από θαλάσσια ψάρια που καταναλώνονται ωμά ή ατελώς ψημένα. Τα περισσότερα παράσιτα είναι πολύ ευαίσθητα στη θέρμανση (μαγείρεμα) και την κατάψυξη (-35°C για 15 ώρες ή -20°C για 7 ημέρες) (De Paola & Toyofuku 2014).

Οι σημαντικότεροι χημικοί ρυπαντές για την ασφάλεια των ψαριών είναι α) τα βαρέα μέταλλα όπως ο υδράργυρος, το κάδμιο και ο μόλυβδος, β) έμμονοι οργανικοί ρύποι όπως οι διοξίνες και τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) και γ) τα κατάλοιπα κτηνιατρικών κυρίως φαρμάκων όπως τα μεταδισουλφίδια (Ababouch 2014). Ο μεθυλ-υδράργυρος είναι ο πιο σημαντικός και επικίνδυνος χημικός ρυπαντής ανθρωπογενούς ή και φυσικής προέλευσης αφού μπορεί να προκαλέσει βλάβες του νευρικού συστήματος σε έμβρυα, βρέφη και μικρά παιδιά. Ανευρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες σε μεγάλους θηρευτές όπως καρχαρίες και ξιφίες αλλά η πρόσληψη του με την κατανάλωση τόνου είναι μεγαλύτερη λόγω της υψηλότερης παγκόσμιας κατανάλωσης αυτού του είδους. Το 2003 ο FAO μείωσε το προσωρινά ανεκτό εβδομαδιαίο όριο πρόσληψης από 3,3 σε 1,6 mg /kg ΣΒ (De Paola & Toyofuku 2014).

Οι θαλάσσιες βιοτοξίνες παράγονται από πολλά και διαφορετικά είδη μικροαλγών και συσσωρεύονται κυρίως σε δίθυρα μαλάκια αλλά και σε ψάρια με την τροφική αλυσίδα. Προκαλούν συγκεκριμένα σύνδρομα τροφικής δηλητηρίασης τα οποία (με βάση την συμπτωματολογία) κατατάσσονται σε δηλητηρίαση: α) διαρροϊκού τύπου (οκαδαϊκό οξύ), β) παραλυτικού τύπου (σαξιτοξίνη), γ) νευροτοξικού τύπου (μπρεβετοξίνη), δ) αμνησιακού τύπου (δομοϊκό οξύ) και ε) τύπου αζασπειρικού οξέος (De Paola & Toyofuku 2014). Στους κινδύνους από βιοτοξίνες στα ψάρια συγκαταλέγονται οι δηλητηριάσεις από τετροδοτοξίνη και από σιγκουατέρα. Η πρώτη είναι μια νευροτοξίνη που προέρχεται από ψάρια puffer (λαγόδοντα). Η δηλητηρίαση από σιγκουατοξίνη προκαλείται από το παράσιτο *Dinoflagellate gambieriscus* που ζει μεταξύ άλλων σε μαγιάτικα, σαβρίδια, κοκκάλια (Αρβανιτογιάννης και συν. 2001).

Τα σκομβροειδή ψάρια (όπως ο τόνος, το σκουμπρί, ο κολιός) αλλά και κάποια μη σκομβροειδή (όπως η σαρδέλα, ο γαύρος, η ρέγγα) περιέχουν υψηλές ποσότητες ελεύθερης ιστιδίνης για λόγους ρύθμισης της όσμωσης. Βακτήρια όπως *Enterobacteriaceae*, *Vibrio*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Morganella*, *Photobacterium* μπορούν να αποκαρβοξυλιώσουν την ιστιδίνη σε ισταμίνη αν οι συνθήκες μετά την αλίευση επιτρέψουν τον πολλαπλασιασμό τους. Αν και ισταμίνη μπορεί να παραχθεί αν τα ψάρια μετά την σύλληψη τους παραμείνουν για ώρες σε θερμά νερά, συνήθως το πρόβλημα προκύπτει λόγω ανεπαρκούς ή καθυστερημένης ψύξης μετά την αλίευση τους (Ababouch 2014, De Paola & Toyofuku 2014).

2. Δηλητηρίαση από ισταμίνη

2.1 Βιογενείς αμίνες και ισταμίνη

Οι βιογενείς αμίνες είναι χαμηλού μοριακού βάρους οργανικές ενώσεις που παράγονται από τον μεταβολισμό φυτών, ζώων και μικροοργανισμών. Η κύρια οδός παραγωγής τους είναι η αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων. Η αφαίρεση της α-καρβοξυλικής ομάδας από την δομή του αμινοξέος οδηγεί στην παραγωγή της αντίστοιχης βιογενούς αμίνης. Τα ένζυμα που προκαλούν την αποκαρβοξυλίωση μπορεί να είναι συστατικά του τροφίμου ή να παράγονται από μικροοργανισμούς (Rodriguez et al 2014). Τα αμινοξέα που αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για τις βιογενείς αμίνες που εμπλέκονται σε τροφοδηλητηριάσεις είναι τα εξής:

- ιστιδίνη → ισταμίνη (εικόνα 5)
- τυροσίνη → τυραμίνη
- υδροξυτρυπτοφάνη → σεροτονίνη
- τρυπτοφάνη → τρυπταμίνη
- λυσίνη → καδαβερίνη
- ορνιθίνη → πουτρεσκίνη
- αργινίνη → σπερμίνη
- αργινίνη → σπερμιδίνη (Silla-Santos 1996).



Εικόνα 5: Αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης σε ισταμίνη (Πηγή: Rawles et al 1996).

Η χημική δομή των βιογενών αμινών μπορεί να είναι αλειφατική (πουτρεσκίνη, καδαβερίνη, σπερμίνη, σπερμιδίνη), αρωματική (τυραμίνη, φαιναυθυλαμίνη), ή ετεροκυκλική (ισταμίνη, τρυπταμίνη) (Silla-Santos 1996). Ανάλογα με τον αριθμό των

αμινομάδων τους διακρίνονται σε μονοαμίνες (τυραμίνη, φαινυλαιθυλαμίνη), διαμίνες (ισταμίνη, τρυπαμίνη, πουτρεσκίνη, καδαβερίνη) και πολυαμίνες (σπερμίνη, σπερμιδίνη) (Rodríguez et al 2014).

Οι βιογενείς αμίνες δεν είναι τοξικές από τη φύση τους, μάλιστα επιτελούν και σημαντικές βιολογικές λειτουργίες στον οργανισμό. Η δράση τους μπορεί να είναι αγγειοτρόπος (τυραμίνη, φαινυλαιθυλαμίνη), ψυχοτρόπος (σεροτονίνη, δοπαμίνη) ή και τα δύο (ισταμίνη). Ο εντερικός σωλήνας των θηλαστικών διαθέτει ένα αποτελεσματικό σύστημα μεταβολισμού των βιογενών αμινών. Η αμινοοξειδάση (MAO) και διαμινοοξειδάση (DAO) που περιέχει εξουδετερώνουν φυσιολογικές δόσεις που προσλαμβάνονται με την τροφή (Brink et al 1990). Η κατανάλωση όμως μεγάλων ποσοτήτων αποτελεί κίνδυνο ειδικά για άτομα με συγγενή ή επίκτητη (π.χ. λόγω λήψης φαρμάκων) ανεπάρκεια του παραπάνω μηχανισμού. Κατανάλωση μικρότερων δόσεων είναι ικανή να προκαλέσει πρόβλημα σε άτομα που πάσχουν από καρδιοαναπνευστικά προβλήματα, υπέρταση ή ανεπάρκεια βιταμίνης B₁₂ (Rodríguez et al 2014).

2.2 Σχηματισμός ισταμίνης στα ψάρια

Τα φρέσκα ψάρια περιέχουν αμελητέες ποσότητες ισταμίνης. Ακατάλληλη συντήρηση και ακατάλληλοι χειρισμοί των ψαριών μετά την σύλληψη τους μπορούν να ευνοήσουν τον πολλαπλασιασμό βακτηρίων που διαθέτουν αποκαρβοξυλάσες της ιστιδίνης. Αρκετά είδη βακτηρίων είναι ικανά να παράγουν ισταμίνη: π.χ. *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *P.mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Serratia fonticola*, *S. liquefaciens* και *Citrobacter freundii*, και άλλα είδη όπως *Clostridium* spp., *Vibrio alginolyticus*, *Acinetobacter lowffi*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas putida*, *Pm. fluorescens*, *Aeromonas* spp. και *Photobacterium* spp. (Jiang et al 2013).

Οι προϋποθέσεις για το σχηματισμό της ισταμίνης στα τρόφιμα είναι η διαθεσιμότητα της ελεύθερης ιστιδίνης, η παρουσία μικροοργανισμών που διαθέτουν αποκαρβοξυλάσες της ιστιδίνης, συνθήκες που επιτρέπουν την ανάπτυξη των βακτηρίων και συνθήκες που ευνοούν την δραστηριότητα της αποκαρβοξυλάσης. Η ελεύθερη ιστιδίνη μπορεί να προϋπάρχει στη σάρκα του ψαριού (π.χ. σκομβροειδή) ή να είναι αποτέλεσμα της πρωτεολυτικής δραστηριότητας. Αποκαρβοξυλάση-θετικά βακτήρια μπορούν να αποτελούν μέρος φυσιολογικής χλωρίδας του τροφίμου ή μπορεί να εισαχθούν με μόλυνση πριν, κατά ή μετά την επεξεργασία των ψαριών (Landete et al 2008).

Τα ψάρια και ειδικά αυτά της οικογένειας των σκομβροειδών σχετίζονται περισσότερο από κάθε άλλο νωπό τρόφιμο με περιστατικά δηλητηρίασης από ισταμίνη λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε ελεύθερη ιστιδίνη. Η ιστιδίνη καταβολίζεται είτε με απαμίνωση προς ουροκανικό οξύ, είτε με αποκαρβοξυλίωση προς ισταμίνη. Υπό φυσιολογικές συνθήκες επικρατεί η πρώτη οδός, σε περίπτωση όμως κακών συνθηκών συντήρησης και μικροβιακής ανάπτυξης σχηματίζεται ισταμίνη (Silla-Santos 1996). Ψάρια που συντηρήθηκαν στους 32 °C απέκτησαν τοξικές συγκεντρώσεις ισταμίνης σε 6 ώρες ενώ στους 21 °C σε 24 ώρες. Στις περισσότερες περιπτώσεις δηλητηρίασης από ισταμίνη η περίοδος ανάμεσα στη σύλληψη των ψαριών και την ψύξη στους 0 °C παρατάθηκε περισσότερο από 12 ώρες ή η θερμοκρασία της σάρκας τους δεν έπεσε ποτέ

κάτω από τους 20 °C. Συνηθισμένη κακή πρακτική της αλιείας με παραγάδια είναι να μένουν τα ψάρια έως και 20 ώρες σε νερά θερμοκρασίας ακόμα και 26 °C οπότε η ισταμίνη παράγεται πριν καν βρεθούν στο αλιευτικό σκάφος (Kim et al 2004).

Αν και ο σχηματισμός της ισταμίνης στα τρόφιμα ελέγχεται με την διασφάλιση της συνέχειας της αλυσίδας ψύξης, έχουν βρεθεί βακτήρια ικανά να παράξουν ισταμίνη ακόμα και σε θερμοκρασίες 0-5 °C. Έτσι μεσόφιλα βακτήρια όπως *C. perfringens*, *M. morgani*, *H. alvei*, *R. planticola*, δεν είναι όπως μέχρι τώρα πιστεύαμε τα σημαντικότερα στην παραγωγή ισταμίνης σε περιπτώσει σκομβροτοξίνωσης. Σε μελέτες το 2004 και το 2006 διαπιστώθηκε ότι ψυχρότροφα βακτήρια όπως *Photobacterium phosphoreum* και *Morganella psychrotolerans* έχουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ισταμίνης σε χαμηλές θερμοκρασίες (Hungerford 2010).

2.3 Ισταμίνη σε άλλα τρόφιμα

Αν και η δηλητηρίαση από ισταμίνη ή σκομβροτοξίνωση έχει συνδεθεί στενά με ψάρια και μάλιστα σκομβροειδή, μπορεί να βρεθεί και σε πολλά άλλα τρόφιμα και ποτά (Hungerford 2010). Όπως αναφέρθηκε η ισταμίνη παράγεται από την δράση της μικροβιακής αποκαρβοξυλάσης στο αμινοξύ ιστιδίνη. Θεωρητικά λοιπόν όλα τα τρόφιμα που περιέχουν ιστιδίνη και έχουν βρεθεί κάτω από συνθήκες που επιτρέπουν την μικροβιακή ανάπτυξη είναι πιθανό να περιέχουν ισταμίνη (Brink et al 1990). Έχουν ανιχνευθεί υψηλά επίπεδα ισταμίνης τόσο σε νωπά όσο και σε ζυμωμένα τρόφιμα. Η διαφορά είναι ότι στα ζυμωμένα (κρασί, τυρί, σάλτσα ψαριού) υπεύθυνοι μικροοργανισμοί είναι τα gram+ οξυγαλακτικά βακτήρια, ενώ στα νωπά τρόφιμα όπως τα ψάρια τα Gram- εντεροβακτήρια (Hungerford 2010).

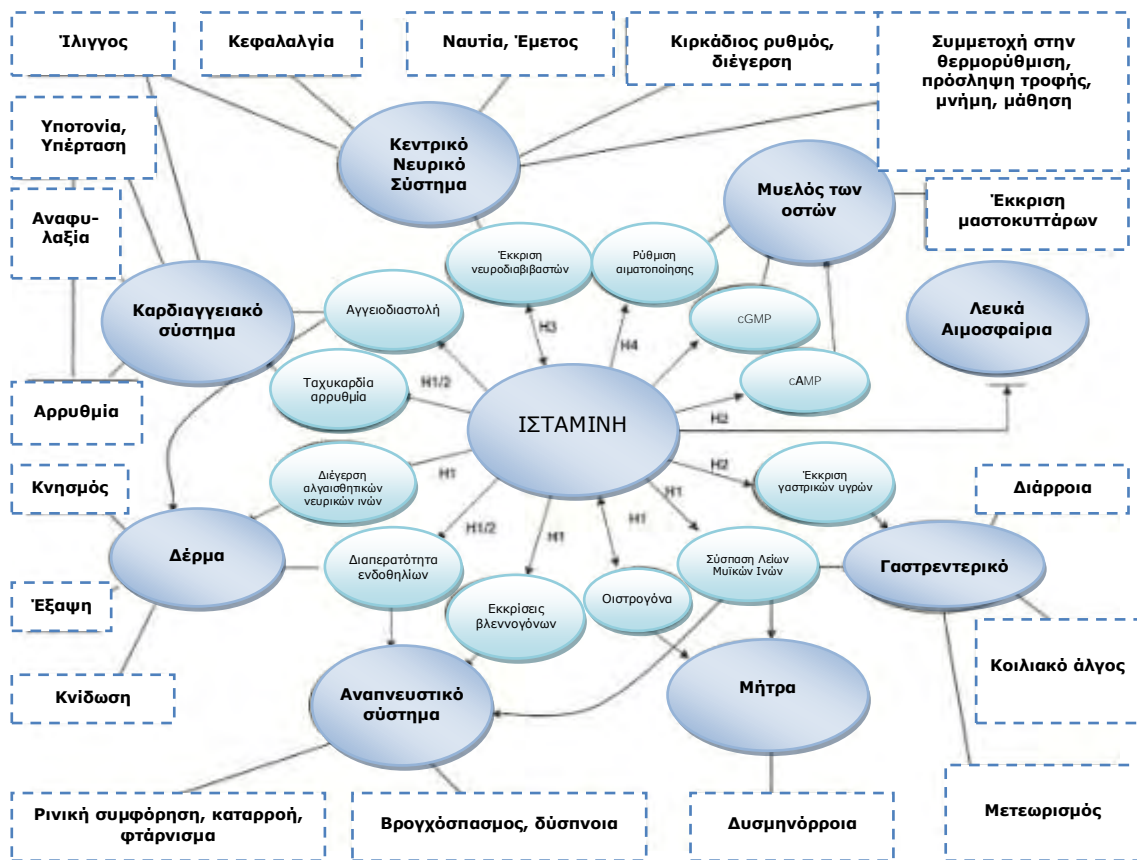
Κατά την διαδικασία παραγωγής ζυμωμένων τροφίμων το προϊόν επωάζεται για ημέρες εβδομάδες ή και μήνες έως ότου αποκτήσει το επιθυμητό επίπεδο ωρίμανσης. Ειδικά στα πρώτα στάδια και αν δεν χρησιμοποιηθεί καλλιέργεια εκκίνησης, μπορεί να επικρατήσουν διάφοροι πληθυσμοί βακτηρίων ικανοί για την παραγωγή ισταμίνης. Αυτό πράγματι έχει παρατηρηθεί σε διάφορα είδη τυριών και αλλαντικών, σε ξινολάχανο και σε κρασί (Brink et al 1990).

2.4 Φυσιολογική δράση της ισταμίνης

Η ισταμίνη (2-[4-ιμιδαζολυλ] αιθυλαμίνη) ανακαλύφθηκε το 1910 από τους Dale και Laidlaw, και ταυτοποιήθηκε ως μεσολαβητής αναφυλακτικών αντιδράσεων το 1932. Η ισταμίνη ανήκει στις βιογενείς αμίνες και συντίθεται από το αμινοξύ ιστιδίνη μέσω της αποκαρβοξυλάσης της L-ιστιδίνης (HDC). Συντίθεται από ιστιοκύτταρα, βασεόφιλα, αιμοπετάλια, ισταμινεργικούς νευρώνες και εντεροχρωματικά κύτταρα, όπου αποθηκεύεται σε ενδοκυτταρικά κυστίδια και απελευθερώνεται κατόπιν διέγερσης (Maintz & Novak, 2007).

Η ισταμίνη είναι μια βιολογικά ισχυρά δραστική ουσία που μπορεί να ασκήσει πολλαπλές φυσιολογικές δράσεις στον οργανισμό. Αν και τα ιστιοκύτταρα και τα

βασεόφιλα του αίματος περιέχουν υψηλές ποσότητες ισταμίνης, οι δράσεις της δεν εμφανίζονται παρά μόνον αν αυτή απελευθερωθεί στην κυκλοφορία του αίματος εξαιτίας, π.χ. μιας αλλεργικής αντίδρασης (Shalaby 1996). Η ισταμίνη ασκεί τις δράσεις της στους ιστούς και τα όργανα μέσω τεσσάρων ειδών υποδοχέων: Histamine Receptor 1 (H1R), H2R, H3R, H4R που διαθέτουν τα διάφορα κύτταρα – στόχοι. Όπως φαίνεται σχηματικά και στην εικόνα 6 προκαλεί συστολή των λείων μυϊκών ινών, αγγειοδιαστολή, αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και την έκκριση βλέννας, ταχυκαρδία, μεταβολές της πίεσης του αίματος, και αρρυθμίες, διεγείρει την έκκριση γαστρικού οξέος και τις αλγαισθητικών νευρικές ίνες. Επιπλέον, η ισταμίνη έχει γίνει γνωστό ότι συμμετέχει στη νευροδιαβίβαση, την ανοσοτροποποίηση, την αιμοποίηση, την επούλωση των πληγών (Maintz & Novak, 2007).



Εικόνα 6: Συνοπτική παρουσίαση των επιδράσεων της ισταμίνης στον οργανισμό (Πηγή: Maintz & Novak, 2007).

Αυτές οι πολλαπλές φυσιολογικές δράσεις της ισταμίνης στον οργανισμό έχουν ιδιαίτερη σημασία για την κατανόηση του μηχανισμού των συμπτωμάτων της δηλητηρίασης από ισταμίνη. Ορισμένες αντιδράσεις που προκαλούνται από την ισταμίνη όπως αγγειοδιαστολή, σύσπαση των λείων μυϊκών ινών, οι μεταβολές της πίεσης του αίματος, η διεγέρση των αλγαισθητικών νευρικών ινών, ταχυκαρδία και αρρυθμίες, φαίνεται να συσχετίζονται με τα συμπτώματα της δηλητηρίασης (Hungerford 2010). Συμπτώματα όπως κνίδωση, κνησμός και έξαψη, καθώς και δράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα είναι αποτέλεσμα σύνδεσης με τους H1 & H2 υποδοχείς (Maintz & Novak 2007). Οι υποδοχείς H3 ρυθμίζουν την απελευθέρωση

νευροδιαβιβαστών στο κεντρικό νευρικό σύστημα και είναι γνωστό ότι προκαλούν πονοκέφαλο, ναυτία και έμετο. Ομοίως, αν και λιγότερα είναι γνωστά για αυτούς, οι υποδοχείς H4 μπορεί να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην δηλητηρίαση από ισταμίνη (Hungerford 2010).

2.5 Μεταβολισμός και τοξικότητα της ισταμίνης

Η παρουσία μικρών ποσοτήτων ισταμίνης στα τρόφιμα δεν είναι απαραίτητα επικίνδυνη. Ο οργανισμός διαθέτει ένα αποτελεσματικό σύστημα αποτοξίνωσης από την ισταμίνη που μπορεί να προσλαμβάνεται με την τροφή ή να σχηματίζεται από τα βακτήρια του εντερικού σωλήνα. Αυτό αποτελείται κυρίως από τα ένζυμα διαμινοξειδάση (Diaminoxidase DAO) και N-μεθυλτρανσφεράση της ισταμίνης (Histamine N-methyl transferase, HNMT) (Shalaby 1996). Σε υγιείς ανθρώπους το παραπάνω σύστημα αποτοξίνωσης μεταβολίζει εύκολα τις προσλαμβανόμενες ποσότητες ισταμίνης σε μη τοξικά προϊόντα. Σε περιπτώσεις όμως τροφίμων όπως κακά συντηρημένα ψάρια με υψηλή περιεκτικότητα σε ισταμίνη εκδηλώνονται συμπτώματα δηλητηρίασης. Επίσης, σε περιπτώσεις ατόμων με δυσλειτουργία του συστήματος αποτοξίνωσης ακόμα και μικρές συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα (Prester 2011).

Σε *in vivo* και *in vitro* μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι η απορρόφηση, ο μεταβολισμός και η τοξικότητα της ισταμίνης μπορεί να επηρεαστούν από την παρουσία και άλλων αμινών. Η τοξικότητα της από του στόματος χορηγούμενης ισταμίνης σε ινδικά χοιρίδια ήταν δεκαπλάσια όταν προηγήθηκε κατά 40 λεπτά χορήγηση πουτρεσκίνης. Αύξηση τοξικότητας της ισταμίνης παρατηρήθηκε και σε σύγχρονη χορήγηση καδαβερίνης. Ανάλογη δράση έχουν η τυραμίνη, η τρυπταμίνη (αναστολέας της DAO) και η β-φαινυλαιθυλαμίνη (αναστολέας της DAO και της HNMT) (Landete 2008). Χαρακτηριστικό είναι ότι η καδαβερίνη και η πουτρεσκίνη είναι αμίνες που ανευρίσκονται συχνά και στα είδη των ψαριών που εμπλέκονται σε περιστατικά δηλητηρίασης από ισταμίνη (Shalaby 1996). Η από του στόματος πειραματική χορήγηση ισταμίνης σε εθελοντές, σε δόσεις ίδιες με αυτές που ανιχνεύτηκαν σε αλλοιωμένα ψάρια δεν κατάφερε να προκαλέσει συμπτώματα δηλητηρίασης. Έτσι επικράτησε η θεωρία ότι η παρουσία κυρίως καδαβερίνης και πουτρεσκίνης ενισχύει, μέσω της αναστολής των ενζύμων που την μεταβολίζουν, την τοξικότητα της ισταμίνης. Αν και έχει υπολογιστεί ότι απαιτούνται συγκεντρώσεις των παραπάνω αμινών, πενταπλάσιες από αυτή της ισταμίνης για να ενισχύσουν την τοξικότητα της, δεν υπάρχουν αντίστοιχα νομοθετικά όρια γι' αυτές (Kim et al 2004).

Οι συγκεντρώσεις ισταμίνης που ανιχνεύτηκαν σε ψάρια που προκάλεσαν περιστατικά δηλητηρίασης είναι συνήθως μεγαλύτερες από 1000 mg/kg. Στην βιβλιογραφία αναφέρονται συγκεντρώσεις από 500 mg/kg έως και 9.190 mg/kg σε ψάρια όπως τόνος, ξιφίας, μάχι – μάχι. Τα δεδομένα επιτήρησης των ετών 1987-1996 στο Ηνωμένο Βασίλειο έδειξαν ότι οι 117 από τις 148 περιπτώσεις έξαρσης κρουσμάτων δηλητηρίασης από ισταμίνη οφειλόταν σε ψάρια που περιείχαν περισσότερα από 1000 mg/kg ισταμίνης (Kim et al 2004). Συγκεντρώσεις ισταμίνης 8-40 mg/100g σάρκας ψαριού θεωρείται ότι μπορούν να προκαλέσουν ήπια συμπτώματα δηλητηρίασης, >40 mg/100g μέτρια συμπτώματα και >100 mg/100g σοβαρά συμπτώματα (Lehane & Olley

2000). Με βάση τα δεδομένα επιτήρησης συγκέντρωση >500 mg/kg θεωρείται ότι αποτελεί απειλή για την υγεία αν και ορισμένες φορές ακόμα και 200 mg/kg μπορεί να αρκούν για να προκαλέσουν συμπτώματα (Kim et al 2004).

Εκτός από τις περιπτώσεις συγγενούς έλλειψης των DAO και HNMT και άλλες καταστάσεις μπορούν να προκαλέσουν ευαισθησία σε μη τοξικές δόσεις ισταμίνης. Η λήψη για παράδειγμα κάποιων αντικαταθλιπτικών όπως και σκευασμάτων για την θεραπεία της φυματίωσης που αναστέλλουν την DAO. Επίσης άτομα που πάσχουν από ελκωτική κολίτιδα, νόσο του Crohn, νεοπλασίες του ορθού και ατοπικό έκζεμα έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία στην ισταμίνη (Prester 2011).

2.6 Συμπτωματολογία και εξέλιξη της νόσου

Η τυπική εικόνα δηλητηρίασης από ισταμίνη συνοδεύεται από συμπτώματα από το δέρμα, το γαστρεντερικό σωλήνα και το νευρικό σύστημα. Αν και πρόκειται για μια αυτοπεριοριζόμενη συνήθως κατάσταση σε άτομα με άσθμα ή στεφανιαία νόσο μπορεί να προκαλέσει σοβαρότερα προβλήματα (Kim et al 2004).

Τα συμπτώματα εμφανίζονται συνήθως αμέσως μετά την κατανάλωση του υπεύθυνου τροφίμου ή το πολύ μία ώρα αργότερα. Περιλαμβάνουν συνήθως μεταλλική γεύση ή αίσθημα καύσου στη γλώσσα και μούδιασμα στο στόμα ακολουθούμενα από κεφαλαλγία, ναυτία, εφίδρωση και γρήγορο και αδύναμο σφυγμό, δυσκαταποσία και δίψα. Χαρακτηρίζεται επίσης από συμπτώματα παρόμοια με αλλεργικά όπως εξανθήματα, ερύθημα και οίδημα στο πάνω μέρος του κορμού (εικόνα 7) και το κεφάλι. Συμπτώματα από το νευρικό σύστημα, όπως άγχος παρατηρούνται σπανιότερα. Από το γαστρεντερικό παρατηρούνται έμετος, διάρροια, κοιλιακός πόνος. Τα συχνότερα εμφανιζόμενα συμπτώματα είναι τα εξανθήματα, η ναυτία, η διάρροια, το ερύθημα, η εφίδρωση, και η κεφαλαλγία (Kim et al 2004, Visciano 2012, Rodriguez et al 2014).



Εικόνα 7: Έντονο ερύθημα του άνω μέρους του κορμού σε περιστατικό δηλητηρίασης από ισταμίνη (Πηγή: www.dermnetnz.org).

Μια πρώτη διάγνωση μπορεί να τεθεί όταν τα συμπτώματα είναι χαρακτηριστικά και η εμφάνιση τους άμεση μετά την κατανάλωση ψαριού που είναι γνωστό ότι εμπλέκεται συχνά σε ανάλογα περιστατικά. Λόγω της συχνά μη τυπικής συμπτωματολογίας όμως είναι δυνατόν να υπάρξει σύγχυση με άλλες τροφιμογενείς ασθένειες και αλλεργικές αντιδράσεις (Lehane & Olley 2000). Πάντως η διάκριση μεταξύ δηλητηρίασης από ισταμίνη και αλλεργικής αντίδρασης γίνεται σχετικά εύκολα, με βάση α) την απουσία ιστορικού αλλεργίας στην καταναλωθείσα τροφή, β) τον μεγάλο αριθμό ταυτόχρονων κρουσμάτων και γ) την παρουσία υψηλών επιπέδων ισταμίνης στα τρόφιμα (Brink et al 1990).

Η διάρκεια των συμπτωμάτων είναι συνήθως τρεις ώρες (εικόνα 8), αλλά μπορεί να διαρκέσει για αρκετές ημέρες. Η σοβαρότητα των συμπτωμάτων είναι ανάλογη με την ποσότητα της ισταμίνης που καταναλώνεται, αλλά το όριο τοξικότητας της ισταμίνης στα τρόφιμα δεν είναι επακριβώς γνωστό λόγω του διαφορετικού βαθμού ευαισθησίας στην ουσία αυτή. Αντιισταμινικά φάρμακα όπως διφαινυδραμίνη και σιμετιδίνη έχουν συχνά χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ανακούφιση των συμπτωμάτων της δηλητηρίασης από ισταμίνη (Kim et al 2004).



Εικόνα 8: Έντονο ερύθημα του άνω μέρους του κορμού και του προσώπου (αριστερά) σε περιστατικό δηλητηρίασης από ισταμίνη και πλήρης υποχώρηση των συμπτωμάτων (δεξιά) 1 ώρα μετά την εμφάνιση τους χωρίς θεραπεία (Πηγή: <http://escholarship.org/>).

2.7 Ισταμίνη στα αλιεύματα και δημόσια υγεία

2.7.1 Επιδημιολογικά δεδομένα

Η ισταμίνη έχει προσελκύσει την περισσότερη προσοχή από όλες τις βιογενείς αμίνες λόγω της εμπλοκής της ως αιτιολογικού παράγοντα σε περιστατικά τροφοδηλητηρίασης. Ψάρια και προϊόντα ψαριών με υψηλές συγκεντρώσεις ισταμίνης εμπλέκονται σε τέτοια περιστατικά επηρεάζοντας κυρίως άτομα με μειωμένη δυνατότητα καταβολισμού της. Η δηλητηρίαση από ισταμίνη αναφέρεται και ως σκομβροτοξίνωση λόγω της συχνής εμπλοκής σκομβροειδών ψαριών (τόνος, σκουμπρί, κολιός) αλλά είναι εξίσου συχνή και σε κάποια μη σκομβροειδή όπως οι ρέγγες, οι σαρδέλες και ο γαύρος (Leuchner et al 2013). Η πρώτη καταγεγραμμένη περίπτωση σκομβροτοξίνωσης συνέβη στην Μεγάλη

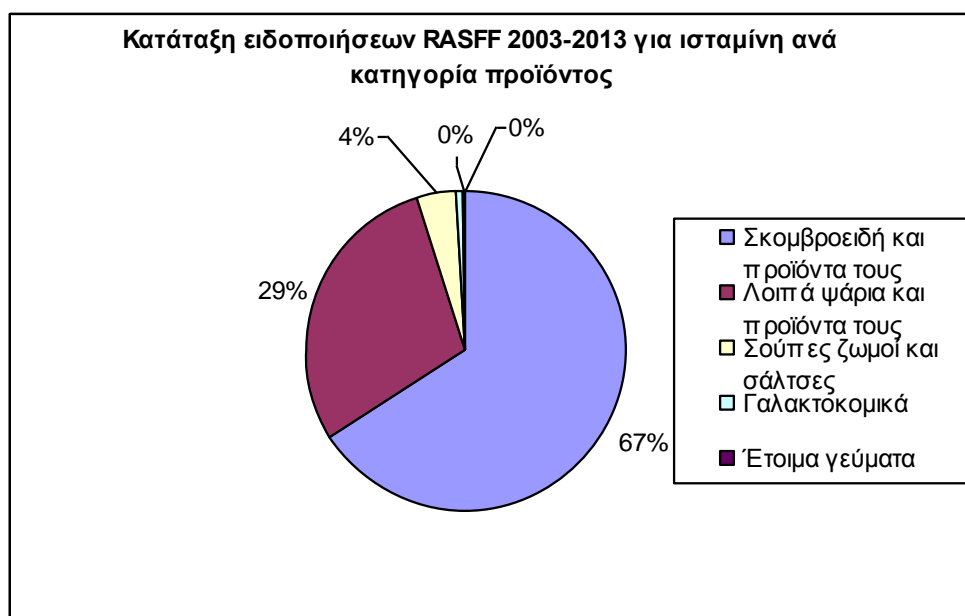
Βρετανία το 1828, στο πλήρωμα ενός σκάφους που κατανάλωσε παλαμίδα, με αποτέλεσμα πέντε εξ' αυτών να ασθενήσουν (Lehane & Olley 2000).

Η ανάγκη για την ύπαρξη έγκαιρης προειδοποίησης στην Ε.Ε για κινδύνους στον τομέα των τροφίμων και των ζωοτροφών οδήγησε στην δημιουργία του συστήματος έγκαιρης προειδοποίησης για τρόφιμα και ζωοτροφές (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF). Αν και η ηλικία του RASFF ξεπερνά τα 30 έτη το 1992 με την Οδηγία 92/59 ΕΚ απέκτησε την πρώτη νομική του βάση. Η πρώτη επίσημη αναφορά του πάντως στη νομοθεσία έγινε στο άρθρο 50 του Καν. 178/2002 (RASFF 2014). Η βάση δεδομένων του RASFF ενημερώνεται καθημερινά από τα Κράτη Μέλη. Περιλαμβάνει λεπτομερείς πληροφορίες για κάθε ειδοποίηση όπως η χώρα που την καταχωρεί, ο τύπος και η ημερομηνία της, το είδος του κινδύνου το είδος του προϊόντος, η ιχνηλασιμότητα του, η προέλευση του κλπ (Leuchner et al 2013).

Την τελευταία δεκαετία καταχωρήθηκαν στο RASFF 423 ειδοποιήσεις για ισταμίνη σε τρόφιμα. Στον πίνακα 5 και το διάγραμμα 1 εμφανίζεται η κατάταξη των ειδοποιήσεων ανά κατηγορία τροφίμου. Είναι εμφανές ότι το 96% των ειδοποιήσεων αφορούν σε ψάρια και προϊόντα ψαριών με τα 2/3 αυτού του ποσοστού να αφορά σκομβροειδή και το 1/3 μη σκομβροειδή ψάρια και προϊόντα ψαριών.

Πίνακας 5. Κατάταξη ειδοποιήσεων RASFF 2003-2013, ανά κατηγορία προϊόντος.

| | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | Σύνολο |
|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|
| Σκομβροειδή ψάρια και προϊόντα τους | 12 | 34 | 16 | 28 | 32 | 28 | 31 | 25 | 17 | 23 | 33 | 279 |
| Λοιπά ψάρια και προϊόντα τους | 8 | 5 | 6 | 2 | 12 | 10 | 19 | 10 | 16 | 19 | 16 | 123 |
| Σούπες ζωμοί και σάλτσες | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 | 1 | 8 | 2 | 0 | 1 | 1 | 18 |
| Γαλακτοκομικά | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| Έτοιμα γεύματα | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Σύνολο | 20 | 39 | 22 | 35 | 45 | 39 | 58 | 37 | 34 | 44 | 50 | 423 |



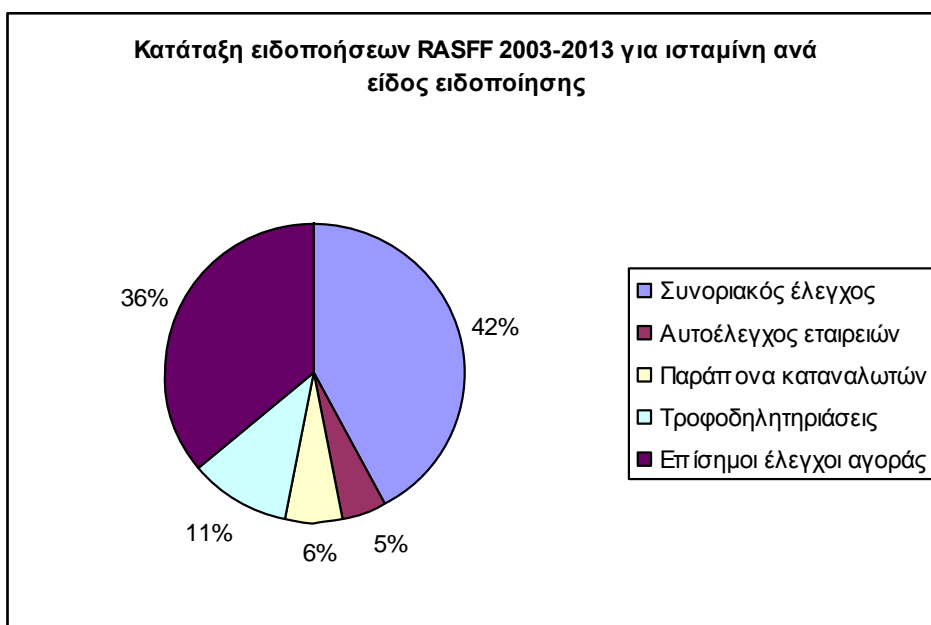
Διάγραμμα 1. Κατάταξη ειδοποιήσεων RASFF 2003-2013, ανά κατηγορία προϊόντος

Στην κατηγορία των σκομβροειδών ψαριών ο τόνος εμφανίζει την μεγαλύτερη συχνότητα ειδοποιήσεων και αντίστοιχα η σαρδέλα για τα μη σκομβροειδή ψάρια.

Σε ότι αφορά το είδος των ειδοποιήσεων όπως φαίνεται στον πίνακα 6 και το αντίστοιχο διάγραμμα 2 οι συνοριακοί έλεγχοι και οι επίσημοι έλεγχοι της αγοράς αποτελούν την πηγή του 78% των ειδοποιήσεων. Σημαντικό είναι και το ποσοστό (11%) των ειδοποιήσεων που σχετίζονται με περιστατικά τροφοδηλητηρίασης. Πρέπει τέλος να επισημάνουμε ότι παρότι το ποσοστό των ειδοποιήσεων που προέρχεται από την εφαρμογή συστημάτων αυτοελέγχου των εταιρειών εμφανίζεται σχετικά μικρό (5%), έχει ανοδική πορεία τα τελευταία 5 χρόνια

Πίνακας 6. Κατάταξη ειδοποιήσεων RASFF 2003-2013, ανά είδος ειδοποίησης.

| | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | Σύνολο |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|
| Συνοριακός έλεγχος | 5 | 9 | 6 | 16 | 25 | 21 | 29 | 15 | 22 | 14 | 15 | 177 |
| Αυτοέλεγχος εταιρειών | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 1 | 1 | 7 | 8 | 21 |
| Παράπονα καταναλωτών | 3 | 1 | 2 | 9 | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 3 | 25 |
| Τροφοδηλητηριάσεις | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 12 | 8 | 3 | 10 | 9 | 47 |
| Επίσημοι έλεγχοι αγοράς | 12 | 29 | 14 | 10 | 15 | 12 | 14 | 13 | 7 | 12 | 15 | 153 |
| Σύνολο | 20 | 39 | 22 | 35 | 45 | 39 | 58 | 37 | 34 | 44 | 50 | 423 |



Διάγραμμα 2. Κατάταξη ειδοποιήσεων RASFF 2003-2013, ανά είδος ειδοποίησης.

Στον πίνακα 7 καταγράφονται τα περιστατικά τροφοδηλητηρίασης από ισταμίνη στην Ε.Ε. για το 2012 με βάση τα τελευταία διαθέσιμα στοιχεία του συστήματος RASFF. Ξεχωρίζει η τελευταία εγγραφή με έξαρση κρουσμάτων στην Λετονία με 42 προσβεβλημένα άτομα. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις περισσότερες περιπτώσεις τα ψάρια έχουν εισαχθεί από χώρες της Νοτιοανατολικής Ασίας και του Ινδικού Ωκεανού όπου η θερμοκρασία των θαλασσών ξεπερνά και τους 25 °C.

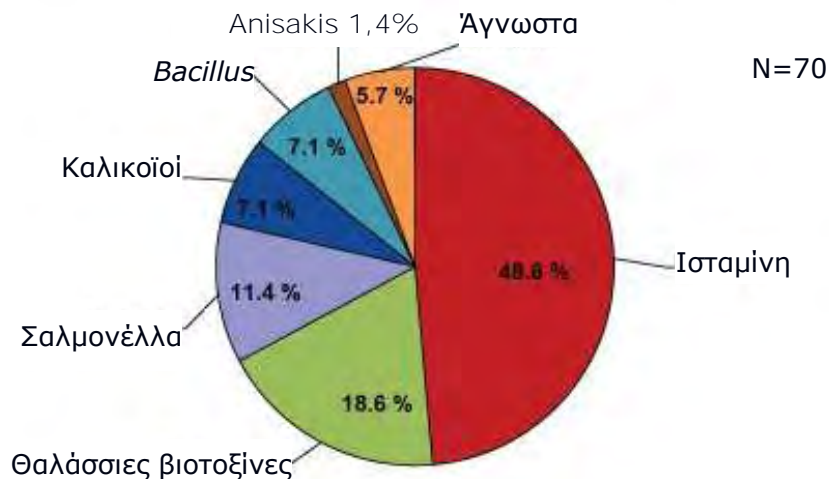
Πίνακας 7. Τροφοδηλητηριάσεις από ισταμίνη στην Ε.Ε. το 2012 (Πηγή: RASFF 2014)

| α/α | Ημερομηνία | Κατάταξη | Χώρα | Περιεχόμενο | Ασθενή άτομα |
|-----|------------|--|------------------|--|--------------|
| 1 | 24/02/2012 | alert ^[1] | Νορβηγία | Ισταμίνη (>3500, 3348 mg/kg) σε φιλέτα κατεψυγμένου τόνου προέλευσης Βιετνάμ. | 1 |
| 2 | 28/02/2012 | alert | Σουηδία | Ισταμίνη (280 mg/kg) σε κατεψυγμένο τόνο προέλευσης Βιετνάμ. | 12 |
| 3 | 14/03/2012 | alert | Ηνωμένο Βασίλειο | Ισταμίνη (1227 mg/kg) σε τυρί Cheddar προέλευσης Ολλανδίας. | 38 |
| 4 | 16/05/2012 | alert | Βέλγιο | Ισταμίνη (5300 mg/kg) σε φιλέτα κατεψυγμένου τόνου προέλευσης Ινδονησίας. | 4 |
| 5 | 27/06/2012 | Information for attention ^[2] | Ιταλία | Ισταμίνη (27,4-253,2 mg/kg) σε κατεψυγμένο τόνο προέλευσης Σρι Λάνκα. | 2 |
| 6 | 10/07/2012 | alert | Βέλγιο | Ισταμίνη (1100, 5100, 5100, 4400, 3900, 80 mg/kg) σε κατεψυγμένο τόνο προέλευσης Βιετνάμ. | 20 |
| 7 | 19/07/2012 | Information for attention | Δανία | Ισταμίνη (1000, 2500, 3200, 2700, 2600, 4800, 4200, 2000, 3300, 4900 mg/kg) σε κατεψυγμένο τόνο προέλευσης Ισπανίας. | 2 |
| 8 | 24/09/2012 | Information for attention | Ιταλία | Ισταμίνη (1904, 1490, 1366, 1608, 1553 mg/kg) σε φιλέτα κατεψυγμένου τόνου προέλευσης Εκουαδόρ. | 6 |
| 9 | 28/09/2012 | alert | Λετονία | Έξαρση κρουσμάτων τροφοδηλητηρίασης από ισταμίνη σε ψάρι εσκολάρ (<i>Lepidocybium flavobrunneum</i>) προέλευσης Ισπανίας | 42 |

[1] alert: συναγερμός, [2] Information for attention: πληροφόρηση για προσοχή

Δεν βρέθηκαν στοιχεία για εξάρσεις κρουσμάτων δηλητηρίασης από ισταμίνη στην Ελλάδα, ούτε στην διαθέσιμη βιβλιογραφία ούτε σε φορείς όπως EFSA και RASFF, πιθανότατα λόγω υποδήλωσης ή υποδιάγνωσης των περιπτώσεων αυτών. Σε ότι αφορά στις ειδοποιήσεις η Ελλάδα έχει καταχωρήσει 14 ειδοποιήσεις (3,3%) από το 2004 έως το 2014 με τις 13 από αυτές να προέρχονται από συνοριακούς ελέγχους και 1 από έλεγχο στην αγορά. Για λόγους σύγκρισης αναφέρουμε ότι η γειτονική Ιταλία έχει καταχωρήσει στο ίδιο διάστημα 163 ειδοποιήσεις (38,5%).

Σύμφωνα με την ετήσια συνοπτική έκθεση της Ε.Ε. του 2012 για τις τάσεις και τις αιτίες εξάρσεων κρουσμάτων τροφιογενούς προέλευσης από τις 70 περιπτώσεις εξάρσεων κρουσμάτων όπου εμπλέκονταν ψάρια ή προϊόντα ψαριών (Διάγραμμα 3) το 48,6% είχε την ισταμίνη ως αιτιολογικό παράγοντα.



Διάγραμμα 3. Κατανομή των εξάρσεων κρουσμάτων τροφοδηλητηρίασης στην Ε.Ε λόγω κατανάλωσης ψαριών ή των προϊόντων τους ανά αιτιολογικό παράγοντα (EFSA 2014)

Από τα στοιχεία της βάσης δεδομένων FOOD του Center for Disease Control δημιουργήθηκε ο πίνακας 8 όπου εμφανίζονται τα περιστατικά τροφοδηλητηρίσεων από ισταμίνη για τα έτη 2000-2011, τα άτομα που ασθένησαν και αυτά που νοσηλεύτηκαν σε νοσοκομείο. Παρατηρείται μια μείωση των περιστατικών από το 2007 και μετά σε σχέση με τα προηγούμενα χρόνια. Τα περιστατικά δηλητηρίασης από ισταμίνη στις Η.Π.Α. οφείλονται σχεδόν αποκλειστικά στην κατανάλωση τόνου και μάχι-μάχι.

Πίνακας 8. Τροφοδηλητηριάσεις από ισταμίνη στις Η.Π.Α. 2000-2011 (Πηγή: CDC 2014)

| Έτος | Δηλητηριάσεις | Ασθενείς | Νοσηλεία | Θάνατος |
|--------|---------------|----------|----------|---------|
| 2000 | 35 | 116 | 3 | 0 |
| 2001 | 26 | 136 | 9 | 0 |
| 2002 | 27 | 94 | 0 | 0 |
| 2003 | 38 | 159 | 1 | 0 |
| 2004 | 29 | 95 | 1 | 0 |
| 2005 | 25 | 108 | 1 | 0 |
| 2006 | 30 | 102 | 6 | 0 |
| 2007 | 18 | 69 | 2 | 0 |
| 2008 | 9 | 45 | 0 | 0 |
| 2009 | 5 | 17 | 0 | 0 |
| 2010 | 10 | 42 | 0 | 0 |
| 2011 | 9 | 25 | 1 | 0 |
| Σύνολα | 261 | 1008 | 24 | 0 |

2.7.2 Νομοθεσία

Λόγω της σημασίας της ισταμίνης για την δημόσια υγεία ο Κανονισμός (Ε.Ε.) αριθ. 2073/2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα όπως τροποποιήθηκε από

τον Κανονισμό (Ε.Ε.) αριθ. 1441/2007 και τον Κανονισμό (Ε.Ε.) αριθ. 1019/2013 την κατατάσσει στα κριτήρια ασφάλειας των τροφίμων. Συγκεκριμένα στο Κεφ.1 παρ.1.26 του Παραρτήματος Ι (πίνακας 9) ορίζει ότι για αλιευτικά προϊόντα από είδη ιχθύων που συνδέονται με υψηλές ποσότητες ιστιδίνης (ιδίως τα είδη ιχθύων των οικογενειών: *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* και *Scombrosidae*) πρέπει επί συνόλου 9 δειγμάτων (n):

- ο μέσος όρος της συγκέντρωσης της ισταμίνης να είναι μικρότερος από 100 mg/kg (m),
- έως και 2 δείγματα (c) μπορούν να έχουν συγκέντρωση από 100 mg/kg έως 200 mg/kg,
- κανένα δείγμα δεν μπορεί να υπερβαίνει τα 200 mg/kg.

Πίνακας 9. Η ισταμίνη ως κριτήριο ασφαλείας στα αλιευτικά προϊόντα σύμφωνα με τον Κανονισμό (Ε.Ε.) αριθ. 2073/2005

| Κατηγορία τροφίμων | Μικροοργανισμοί τοξίνες και οι μεταβολίτες τους | Πλάνο δειγματοληψίας[1] | | Όρια | | Αναλυτική μέθοδος αναφοράς | Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο |
|--|---|-------------------------|---|-----------|-----------|----------------------------|---|
| | | n | c | m | M | | |
| Αλιευτικά προϊόντα από είδη ιχθύων που συνδέονται με υψηλές ποσότητες ιστιδίνης[2] | Ισταμίνη | 9 | 2 | 100 mg/kg | 200 mg/kg | HPLC | Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά την διάρκεια διατήρησής τους |

1] n = αριθμός μονάδων δειγματοληψίας που αποτελούν το δείγμα· c = αριθμός μονάδων δειγματοληψίας με τιμές μεταξύ m και M.

[2]Ιδίως τα είδη ιχθύων των οικογενειών: *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* και *Scombrosidae*.

Σε επίπεδο λιανικής πώλησης ο Κανονισμός επιτρέπει την λήψη μονών δειγμάτων.

Η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, F.D.A.) των Η.Π.Α. θέτει τα 50 mg/kg ως όριο παρουσίας της ισταμίνης στα βρώσιμα μέρη του ψαριού (FDA 2011).

2.8 Μέθοδοι προσδιορισμού ισταμίνης

Αρκετές μέθοδοι για την ανάλυση βιογενών αμινών στα τρόφιμα που βασίζονται σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC), υγροχρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC), χρωματογραφία αερίου (Gas Chromatography, GC), βιοχημικούς προσδιορισμούς και τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis, CE) έχουν μέχρι σήμερα περιγραφεί (Onal 2007).

Οι μέθοδοι της υγροχρωματογραφίας για τον προσδιορισμό της ισταμίνης, μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες:

α) Αυτές που ανιχνεύουν την ισταμίνη ως έχει. Σχετικά απλές μέθοδοι, σύντομες για τα δεδομένα της χρωματογραφίας, αλλά με προβλήματα ειδικότητας και ευαισθησίας.

β) Αυτές που ανιχνεύουν την ισταμίνη με την βοήθεια της προ- ή μετά στήλης παραγωγοποίησης της και με φθορισμομετρική ανάλυση. Ο σχηματισμός του

φθορίζοντας παραγώγου συνοδεύεται από καλή ευαισθησία και ειδικότητα, υψηλούς χρόνους ανάλυσης, και προβλήματα αναπαραγωγιμότητας και σταθερότητας του παραγώγου (Cinquina et al 2004).

Οι περισσότερες από τις μεθόδους προσδιορισμού ισταμίνης στα ψάρια και τα προϊόντα τους χρησιμοποιούν αντίστροφης φάσης υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Συνδυάζεται με συστήματα ανίχνευσης που βασίζονται στην προ-στήλης, παραγωγοποίηση για την παραγωγή προϊόντων φθορισμού ή ισχυρών χρωμοφόρα, αλλά και άμεση ανίχνευση UV του δακτυλίου ιμιδαζόλης της ισταμίνης έχει επίσης εφαρμοστεί (Hungerford 2010).

Νέα εργαλεία για την εκχύλιση υγρής ή στερεάς φάσης έχουν αναπτυχθεί ώστε να βελτιωθεί η ευαισθησία τους και να αυξηθεί η απόδοση της εκχύλισης. Επίσης έχουν προταθεί νέες μέθοδοι παραγωγοποίησης που μειώνουν τον απαιτούμενο χρόνο και αυξάνουν την απόδοση. Η χρήση της Ultra HPLC μειώνει σημαντικά τον χρόνο έκλουσης στα 10 λεπτά σε σχέση με τα 20-60 λεπτά της απλής HPLC. Τέλος ο συνδυασμός της HPLC με ανιχνευτές MS-MS (φασματογράφοι μάζας εν σειρά) απαλείφει την ανάγκη παραγωγοποίησης των αμινών (Erim 2013).

Η TLC είναι απλή και δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό, αλλά οι περισσότερες από τις δημοσιευμένες μεθόδους απαιτούν πολύ χρόνο για την ανάλυση και δεν δίνουν ακριβή αποτελέσματα (ημι-ποσοτική). Η GC δεν εφαρμόζεται τόσο συχνά για τον προσδιορισμό των βιογενών αμινών (Onal 2007). Το γεγονός ότι είναι ουσίες χαμηλού M.B., ευδιάλυτες στο νερό και με ελάχιστα πτητικές δεν ευνοεί την χρήση της GC (Rodriguez et al 2014). Η CE με ανίχνευση φθορισμού έχει γίνει ένα πιο δημοφιλές αναλυτικό εργαλείο λόγω της υψηλότερης ευαισθησίας με ηλεκτροχημική και υπεριώδη ανίχνευση. Αφού οι βιογενείς αμίνες δεν εμφανίζουν ισχυρό φθορισμό, δεν θα μπορούσαν να ανιχνευθούν απευθείας με υψηλή ευαισθησία (Onal 2007).

Η μέθοδος HPLC έχει ένα πλεονέκτημα έναντι άλλων μεθόδων με την ικανότητα της να ανιχνεύει άλλες βιογενείς αμίνες μαζί με ισταμίνη. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται ως επίσημη μέθοδος για την ανίχνευση ισταμίνης σε προϊόντα τροφίμων σε πολλές χώρες. Η Ε.Ε. απαιτεί επίσης τη χρήση της μεθόδου HPLC από το 2005 για την ανάλυση ισταμίνης σε προϊόντα αλιείας στα πλαίσια επίσημων ελέγχων (Κανονισμός (Ε.Ε.) αριθ. 2073/2005). Ωστόσο, αυτή η μέθοδος απαιτεί πολλές τεχνικές δεξιότητες και είναι πάρα πολύ ακριβή για να χρησιμοποιηθεί στις περισσότερες εγκαταστάσεις ή μονάδες τροφίμων (Kose et al 2011).

Η χρήση βιοαισθητήρων έχει πλεονεκτήματα, όπως το χαμηλό κόστος, τη σύντομη ανάλυση, την απλότητα της χρήσης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί έξω από ένα οργανωμένο εργαστήριο (Onal 2007).

Οι ενζυμικές μέθοδοι είναι απλές, γρήγορες, χαμηλού κόστους και παρέχουν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Οι εμπορικές συσκευασίες που κυκλοφορούν διακρίνονται σε ποιοτικές, ημιποσοτικές και ποσοτικές με εύρος ανίχνευσης από 1-500 mg/kg. Βασίζονται σε δύο μεθόδους ανίχνευσης. Την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA που αξιολογεί τον άμεσο ανταγωνισμό μιας σταθερής ουσίας με την ένζυμο-συνδεδεμένη ουσία του δείγματος για έναν περιορισμένο αριθμό αντισωμάτων, και τη

χημική χρωματομετρική ανάλυση, όπου ένα ένζυμο καταλύει μία αλλαγή χρώματος στην αντίδραση με το υπόστρωμα (Rodriguez et al 2014).

Από τις διαθέσιμες τεχνικές που αναφέρθηκαν προηγουμένως, η HPLC, η CE και η ELISA είναι οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές μέθοδοι. Τα συμπεράσματα μελέτης σύγκρισης αυτών των τριών τεχνικών όσον αφορά την ταχύτητα, ευχρηστία, όριο ανίχνευσης, γραμμικότητα, την ευαισθησία και την ακρίβεια ήταν τα εξής: Η ELISA είναι πολύ απλή μέθοδος με υψηλή ευαισθησία (0,05 mg / kg που αντιστοιχεί σε 2,5 mg/kg στο δείγμα), αλλά απαιτεί επιβεβαίωση με HPLC ή CE για δείγματα με συγκέντρωση ισταμίνης πάνω από το νόμιμο όριο (200 mg/kg). Ως εκ τούτου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για την προκαταρκτική ταυτόχρονη διαλογή πολλών δειγμάτων. Οι τεχνικές HPLC και CE μπορούν να αυτοματοποιηθούν (αφού δεν απαιτούν χρονοβόρες και πολύπλοκες διαδικασίες προετοιμασίας του δείγματος), παρουσιάζοντας μια πολύ υψηλή ευαισθησία όταν συνδυάζεται με UV-DAD ή MS ανιχνευτή (Muscarella et al 2005). Η εμπορική συσκευασία που χρησιμοποιήθηκε στην παραπάνω μελέτη ήταν η Ridascreen Histamine από την R- Biopharm.

Σε μελέτη σύγκρισης επτά εμπορικών συσκευασιών ανοσοχημικών μεθόδων ανίχνευσης και προσδιορισμού της ισταμίνης (πίνακας 10) σε προϊόντα ψαριών μεταξύ τους αλλά και με την μέθοδο HPLC η Histamine Food ELISA της LDN GmbH που κυκλοφορεί και ως Ridascreen Histamine από την R- Biopharm ήταν η πλέον αξιόπιστη. Πράγματι η Histamine Food ELISA της LDN επέδειξε την καλύτερη συσχέτιση με την μέθοδο HPLC ($R^2 = 0.9132$), με το 91% των αποτελεσμάτων να είναι παρόμοια με αυτά της HPLC. Στην δεύτερη θέση ήρθε το Veratox της Neogen με το 53% των αποτελεσμάτων να είναι παρόμοια με αυτά της HPLC (Kose 2011).

Πίνακας 10. Ιδιότητες των εμπορικών συσκευασιών ELISA που συγκρίθηκαν (Πηγή: Kose 2011 τροποποιημένος)

| Εμπορική ονομασία | Εταιρεία | Αναλυτική ευαισθησία | Παράμετροι ποσοτικοποίησης | Απαιτούμενος χρόνος |
|----------------------|-------------|----------------------|----------------------------|---------------------|
| Veratox | Neogen | <2,5 mg/kg | Ποσοτική 0-50 mg/kg | 60 min. |
| Histamine Food ELISA | LDN GmbH | <2,5 mg/kg | Ποσοτική 2,5- 250 mg/kg | 120 min |
| Ridascreen Histamine | R- Biopharm | | | |
| HistaQuant | Biomedix | 0-500 mg/kg | Ποσοτική 0-500 mg/kg | 90 min |
| Histameter | Biomedix | 0-50 mg/kg | Ποιοτική 0-50 mg/kg | 80 min |
| Histasure method | LDN GmbH | 50 mg/kg | Ποιοτική 50 mg/kg | 20-30 min |
| Transia tube | Raisio | | Ποιοτική | |
| Histamine HI0440 | Diagnostics | 100 mg/kg | 100 mg/kg | 80 min |
| Transia tube | Raisio | | Ημιποσοτική | |
| Histamine HI0480 | Diagnostics | 25 mg/kg | 25-200 mg/kg | 80 min |

Σε μελέτη που έγινε σε δείγματα ψαριών από την Βόρεια Ελλάδα 36 δείγματα αναλύθηκαν τόσο με HPLC όσο και με ELISA (Ridascreen Histamine). Η σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων έδειξε πολύ καλή συσχέτιση για συγκεντρώσεις έως 50 mg/kg ($R^2 = 0,97$) ενώ για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τα αποτελέσματα της ELISA διέφεραν έως και δύο τυπικές αποκλίσεις από αυτά της HPLC (Vosikis et al 2008)

ΜΕΡΟΣ 2^ο

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός ισταμίνης σε σκομβροειδείς ιχθύες της αγοράς της Λάρισας.

Στόχος του ελέγχου ήταν να εκτιμηθεί αν σκομβροειδείς ιχθύες που διατίθενται στην αγορά υπερβαίνουν ή όχι τα όρια ισταμίνης που έχουν καθιερωθεί από την νομοθεσία με τον Κανονισμό (Ε.Ε.) αριθ. 2073/2005 και επομένως αν αποτελούν δυνητικό κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών.

3. Μεθοδολογία

3.1 Συλλογή των δειγμάτων

Νωπά ψάρια της οικογένειας των σκομβροειδών (κολιός, *Scomber japonicus colias*) συλλέχθηκαν από τέσσερις διαφορετικές υπαίθριες αγορές της Λάρισας. Συλλέχθηκαν συνολικά 50 δείγματα, κατά το χρονικό διάστημα από 11/07/2013 έως 28/08/2013. Επειδή η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε επίπεδο λιανικής πώλησης λήφθηκαν μονά δείγματα. Κάθε δείγμα αποτελούνταν από ένα ακέραιο ψάρι βάρους τουλάχιστον 100 g. Τα δείγματα ζυγίζονταν, στη συνέχεια πραγματοποιούνταν εκτίμηση νωπότητας σύμφωνα με τα κριτήρια του Καν. 2406/96 Ε.Ε., τοποθετούνταν σε ατομικό πλαστικό περιέκτη και τέλος σημαίνονταν. Τα δείγματα μεταφέρονταν στο εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με ισοθερμικό δοχείο ώστε η θερμοκρασία τους να παραμείνει κοντά στους 0 °C και εκεί καταψύχθηκαν στους -70 °C έως την εξέταση τους.

3.2 Προσδιορισμός ισταμίνης

Η εξέταση των δειγμάτων έγινε με την μέθοδο της ανταγωνιστικής ELISA με την εμπορική συσκευασία RIDASCREEN Histamine της εταιρείας R-Biopharm. Η συσκευασία της δοκιμασίας παρέχει υλικά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της παραγωγοποιημένης ισταμίνης σε εκχυλίσματα τροφίμων. Η παραγωγοποίηση είναι μέρος της προετοιμασίας των δειγμάτων. Με τη χρήση του αντιδραστηρίου ακυλίωσης, η ισταμίνη μετατρέπεται σε ίση ποσότητα N-ακυλισταμίνης. Η ισταμίνη είναι δεσμευμένη στη στερεά φάση της πλάκας μικροτίτλου. Η ακυλιωμένη ισταμίνη και η

δεσμευμένη στην πλάκα μικροτίτλου ισταμίνη ανταγωνίζονται μεταξύ τους για ένα σταθερό αριθμό θέσεων δέσμευσης του αντιορού. Όταν το σύστημα βρίσκεται σε ισορροπία, ελεύθερο αντιγόνο και ελεύθερα συμπλέγματα αντιγόνου - αντιορού απομακρύνονται με την πλύση της πλάκας. Το αντίσωμα που δεσμεύεται από την ισταμίνη της στερεάς φάσης ανιχνεύεται με αντι-αντιορό συζευγμένο με υπεροξειδάση. Το υπόστρωμα TMB / αντίδραση υπεροξειδάσης μετράται στα 450 nm. Η ποσότητα του αντισώματος που δεσμεύεται με την ισταμίνη στερεά φάση είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τη συγκέντρωση ισταμίνης του δείγματος.

3.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων και αντιδραστηρίων

Προετοιμασία δείγματος.

10 g φρέσκου ψαριού ομογενοποιούνται με την χρήση μπλέντερ. Προσθήκη 1 g φρέσκου ψαριού σε 9 ml αποσταγμένου νερού και ανάμιξη για 1 - 2 λεπτά με τη χρήση συσκευής stomacher. Εισαγωγή με σιφόνιο 1 ml του εναιωρήματος σε ένα σωλήνα Eppendorf ή παρόμοιο και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 2500 g. Αφαίρεση λιπιδικής στοιβάδας με αναρρόφηση. Καλή ανάμιξη 1 ml του υπερκειμένου με 9 ml αποσταγμένο νερό. Αραίωση 200 μl του παραπάνω διαλύματος σε 9,8 ml αποσταγμένο νερό. Χρησιμοποιούνται 100 μl του τελικού διαλύματος για την ακυλίωση.

Τα αντιδραστήρια και τα δείγματα πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν την έναρξη της δοκιμής.

Διάλυμα πλύσης: Παρασκευάζεται με την διάλυση 10 ml από το παρεχόμενο συμπυκνωμένο διάλυμα σε αποσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 500 ml. Συντηρείται σε θερμοκρασία 2-8 °C. Η διάρκεια ζωής του είναι περίπου 4 εβδομάδες.

Παράγοντας ακυλίωσης: έχει σημείο πήξης 18,5 °C γι' αυτό πρέπει να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) πριν την έναρξη της δοκιμής. Εναλλακτικά μπορεί να αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου χωριστά από τα υπόλοιπα αντιδραστήρια.

Ακυλίωση

Προσθήκη 100 μl από τα πρότυπα διαλύματα, τα διαλύματα ελέγχου και τα διαλύματα των δειγμάτων στα βοθρία της πλάκας αντίδρασης. Προσθήκη 25 μl παράγοντα ακυλίωσης και 200 μl διαλύματος ακυλίωσης σε όλα τα βοθρία και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε συσκευή ανάδευσης ή μετά από σύντομη κυκλική κίνηση με το χέρι.

3.2.2 Εκτέλεση δοκιμασίας ELISA

1^ο στάδιο

Προσθήκη 25 μl από τα ακυλιωμένα πρότυπα διαλύματα, τα διαλύματα ελέγχου και τα διαλύματα των δειγμάτων στα βοθρία της πλάκας μικροτίτλου. Προσθήκη 100 μl αντιορού ισταμίνης σε όλα τα βοθρία και επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία

δωματίου (20-25°C) σε συσκευή ανάδευσης (shaker) ή για 40 λεπτά μετά από σύντομη κυκλική κίνηση με το χέρι.

2^ο στάδιο

Απόρριψη του περιεχομένου των βοθρίων και έκπλυση τους τρεις φορές με 250 μl διαλύματος έκπλυσης κάθε φορά. Διασφάλιση της πλήρους εκκένωσης των βοθρίων με χτύπημα πάνω σε επιφάνεια με απορροφητικό υλικό (χαρτί).

3^ο στάδιο

Προσθήκη 100 μl αντι-αντιορού συζευγμένου με υπεροξειδάση (conjugate) σε όλα τα βοθρία και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) σε συσκευή ανάδευσης (shaker) ή για 20 λεπτά μετά από σύντομη κυκλική κίνηση με το χέρι.

4^ο στάδιο

Απόρριψη του περιεχομένου των βοθρίων και έκπλυση τους τρεις φορές με 250 μl διαλύματος έκπλυσης κάθε φορά. Διασφάλιση της πλήρους εκκένωσης των βοθρίων με χτύπημα πάνω σε επιφάνεια με απορροφητικό υλικό (χαρτί).

5^ο στάδιο

Προσθήκη 100 μl χρωμογόνου (substrate) σε όλα τα βοθρία και επώαση για 15±2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) σε συσκευή ανάδευσης (shaker) ή μετά από σύντομη κυκλική κίνηση με το χέρι. Αποφυγή έκθεσης στο φως κατά τη διάρκεια της επώασης!

6^ο στάδιο

Προσθήκη 100 μl διαλύματος παύσης (stop solution) σε όλα τα βοθρία και καλή ανακίνηση της πλάκας με το χέρι για να διασφαλιστεί η ομοιόμορφη κατανομή του. Μέτρηση της απορρόφησης μέσα στα επόμενα 10 λεπτά σε συσκευή ανάγνωσης πλάκας μικροτίτλου ρυθμισμένη στα 450 nm.

3.2.3 Υπολογισμός συγκέντρωση ισταμίνης

Με την βοήθεια των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης ισταμίνης κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη. Από αυτή προκύπτει η εξίσωση με την βοήθεια της οποίας υπολογίζεται η συγκέντρωση κάθε δείγματος. Για τον τελικό υπολογισμό της συγκέντρωσης το αποτέλεσμα που εξάγεται με την βοήθεια της καμπύλης πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή διάλυσης που στην περίπτωση των νωπών ψαριών είναι 5.000.

4 Αποτελέσματα

Στον πίνακα 11 καταγράφονται αναλυτικά τα δείγματα των ψαριών.

Πίνακας 11. Δείγματα ψαριών.

| α/α | Βάρος (g) | Ημερομηνία λήψης |
|------------|------------------|-------------------------|
| 1 | 175 | 11/07/2013 |
| 2 | 240 | 11/07/2013 |
| 3 | 188 | 11/07/2013 |
| 4 | 235 | 11/07/2013 |
| 5 | 235 | 11/07/2013 |
| 6 | 190 | 11/07/2013 |
| 7 | 177 | 11/07/2013 |
| 8 | 168 | 11/07/2013 |
| 9 | 187 | 11/07/2013 |
| 10 | 182 | 11/07/2013 |
| 11 | 179 | 11/07/2013 |
| 12 | 108 | 13/07/2013 |
| 13 | 102 | 13/07/2013 |
| 14 | 101 | 13/07/2013 |
| 15 | 137 | 13/07/2013 |
| 16 | 113 | 13/07/2013 |
| 17 | 101 | 13/07/2013 |
| 18 | 114 | 13/07/2013 |
| 19 | 115 | 13/07/2013 |
| 20 | 112 | 13/07/2013 |
| 21 | 146 | 13/07/2013 |
| 22 | 175 | 13/07/2013 |
| 23 | 122 | 13/07/2013 |
| 24 | 110 | 13/07/2013 |
| 25 | 104 | 13/07/2013 |
| 26 | 103 | 13/07/2013 |
| 27 | 100 | 30/07/2013 |
| 28 | 109 | 30/07/2013 |
| 29 | 103 | 30/07/2013 |
| 30 | 100 | 30/07/2013 |
| 31 | 140 | 30/07/2013 |
| 32 | 123 | 30/07/2013 |
| 33 | 146 | 30/07/2013 |
| 34 | 117 | 30/07/2013 |
| 35 | 125 | 30/07/2013 |
| 36 | 145 | 30/07/2013 |
| 37 | 140 | 30/07/2013 |
| 38 | 181 | 30/07/2013 |
| 39 | 116 | 28/08/2013 |
| 40 | 118 | 28/08/2013 |
| 41 | 121 | 28/08/2013 |
| 42 | 115 | 28/08/2013 |
| 43 | 136 | 28/08/2013 |
| 44 | 110 | 28/08/2013 |
| 45 | 135 | 28/08/2013 |
| 46 | 121 | 28/08/2013 |
| 47 | 108 | 28/08/2013 |
| 48 | 117 | 28/08/2013 |
| 49 | 101 | 28/08/2013 |
| 50 | 103 | 28/08/2013 |

4.1 Εκτίμηση νοπότητας στα δείγματα

Η εκτίμηση της νοπότητας των δειγμάτων έγινε, όπως προαναφέρθηκε αμέσως μετά την συλλογή τους. Χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια του Κανονισμού (Ε.Ε.) αριθ. 2406/1996 όπως περιγράφονται στην παράγραφο 1.2.3. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στον πίνακα 12. Σε γενικές γραμμές τα δείγματα ήταν αρκετά φρέσκα αφού τα περισσότερα κατατάχθηκαν στην κατηγορία Α. Μόνο επτά δείγματα κατατάχθηκαν στην κατηγορία Β. Σε αυτά παρατηρήθηκε θολερότητα των οφθαλμών, μαλακή σάρκα και εκκρίσεις της έδρας τους. Δεν διαπιστώθηκαν δυσάρεστες οσμές ή αποχρωματισμός των βραγχίων.

Πίνακας 12. Εκτίμηση της νοπότητας των δειγμάτων

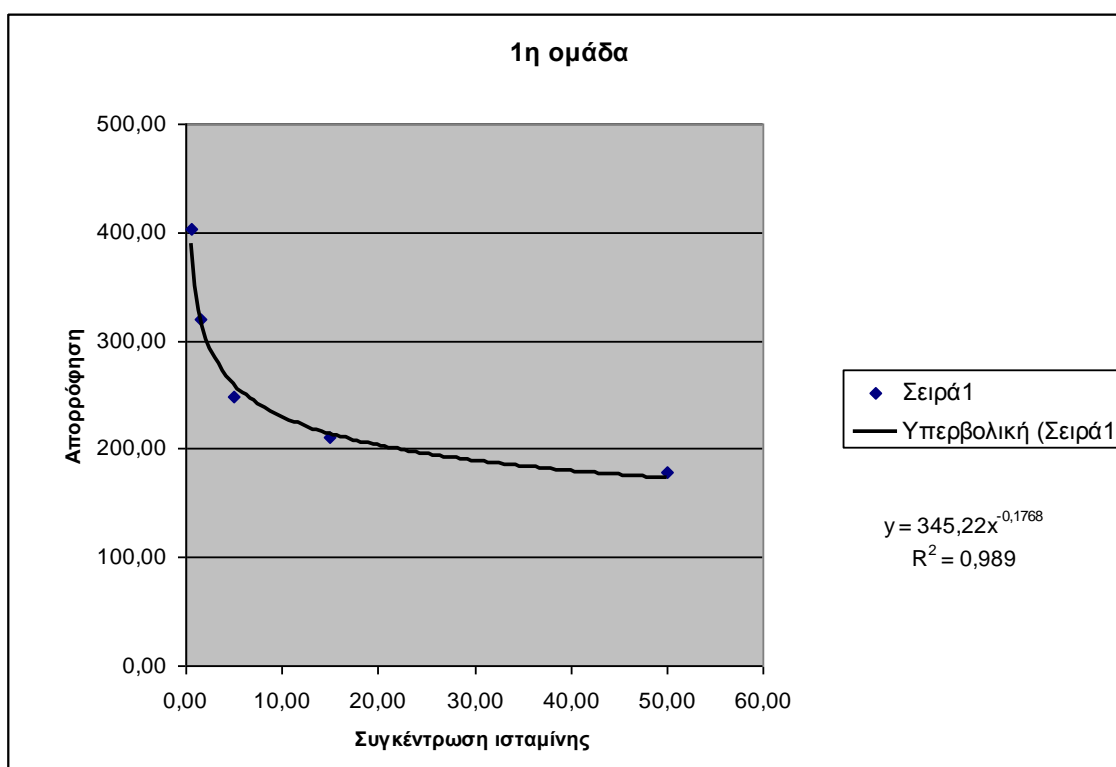
| a/a | Κατάταξη νοπότητας | Παρατηρήσεις |
|-----|--------------------|----------------------------------|
| 1 | A | |
| 2 | A | |
| 3 | A | |
| 4 | A | |
| 5 | A | |
| 6 | A | |
| 7 | A | |
| 8 | A | |
| 9 | A | |
| 10 | A | |
| 11 | A | |
| 12 | A | |
| 13 | A | |
| 14 | A | |
| 15 | A | |
| 16 | A | Απουσία ακαμψίας |
| 17 | A | |
| 18 | A | Απουσία ακαμψίας |
| 19 | A | |
| 20 | A | |
| 21 | A | |
| 22 | A | |
| 23 | A | |
| 24 | A | |
| 25 | A | |
| 26 | A | Απουσία ακαμψίας |
| 27 | A | |
| 28 | A | |
| 29 | A | |
| 30 | A | |
| 31 | A | |
| 32 | B | |
| 33 | A | |
| 34 | A | |
| 35 | B | Εκκρίσεις έδρας |
| 36 | A | Εκκρίσεις έδρας |
| 37 | A | |
| 38 | A | |
| 39 | B | Μαλακή κοιλιά |
| 40 | B | Μαλακή κοιλιά, θολοί οφθαλμοί |
| 41 | B | Μαλακή κοιλιά, θολοί οφθαλμοί |
| 42 | B | Εκκρίσεις έδρας, |

| | | |
|----|---|--|
| 43 | B | απουσία ακαμψίας Εκκρίσεις έδρας, απουσία ακαμψίας |
| 44 | A | Απουσία ακαμψίας |
| 45 | A | |
| 46 | A | |
| 47 | A | |
| 48 | A | |
| 49 | A | |
| 50 | A | |

4.2. Αναλυτικά Αποτελέσματα

Η διαδικασία ελέγχου των δειγμάτων για παρουσία ισταμίνης έγινε σε τρεις φάσεις. Στην πρώτη φάση ελέχθησαν 11 δείγματα, στη δεύτερη 15 και στην τρίτη 24. Κάθε φορά η παρουσία ισταμίνης στα δείγματα υπολογίστηκε με τη χρήση πρότυπης καμπύλης που κατασκευάστηκε από τα πρότυπα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης. Με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας κάθε δείγματος προς έλεγχο και χρήση της εξίσωσης που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη σε κάθε φάση του πειράματος βρίσκουμε την συγκέντρωση για κάθε δείγμα.

Η πρώτη φάση του πειράματος έγινε 25/07/2013. Μετρώντας την οπτική απορρόφηση των προτύπων δειγμάτων δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη. (Διάγραμμα 4) Σύμφωνα με την καμπύλη αυτή προκύπτει η εξίσωση $y = 345,22 x^{-0,177}$ από την οποία βρίσκουμε το x για κάθε δείγμα μας. (Πίνακας 13)

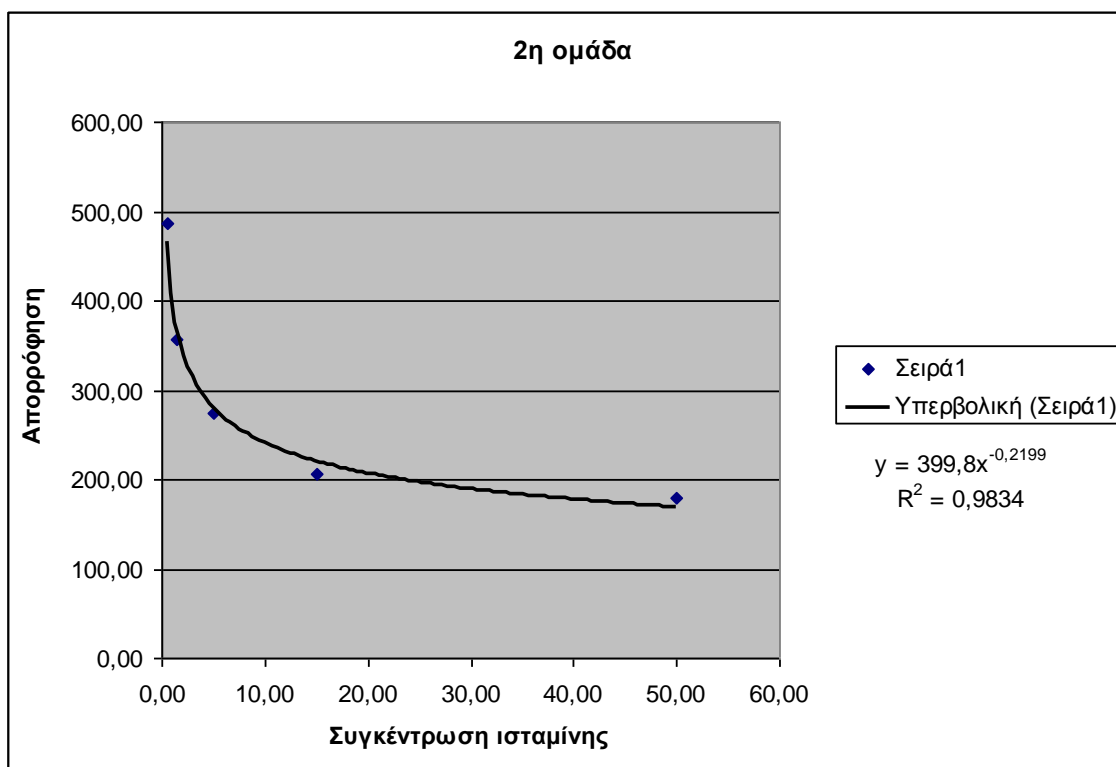


Διάγραμμα 4. Πρότυπη καμπύλη 1^{ης} ομάδας δειγμάτων.

Πίνακας 13. Συγκέντρωση ισταμίνης με βάση την πρότυπη καμπύλη (1^η ομάδα)

| Αριθμός δείγματος | Συγκέντρωση (x) |
|-------------------|-----------------|
| 1 | 0,53 |
| 2 | 0,12 |
| 3 | 0,13 |
| 4 | 0,12 |
| 5 | 23,43 |
| 6 | 0,07 |
| 7 | 0,06 |
| 8 | 0,05 |
| 9 | 0,05 |
| 10 | 0,08 |
| 11 | 0,06 |

Η δεύτερη φάση του πειράματος έγινε στις 2 Σεπτεμβρίου 2013 και η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια. Η πρότυπη καμπύλη που προέκυψε φαίνεται στο διάγραμμα 5. Σύμφωνα με την καμπύλη αυτή προκύπτει η εξίσωση $y = 399,8 x^{-0,22}$ από την οποία βρίσκουμε το x για κάθε δείγμα μας. (Πίνακας 14)

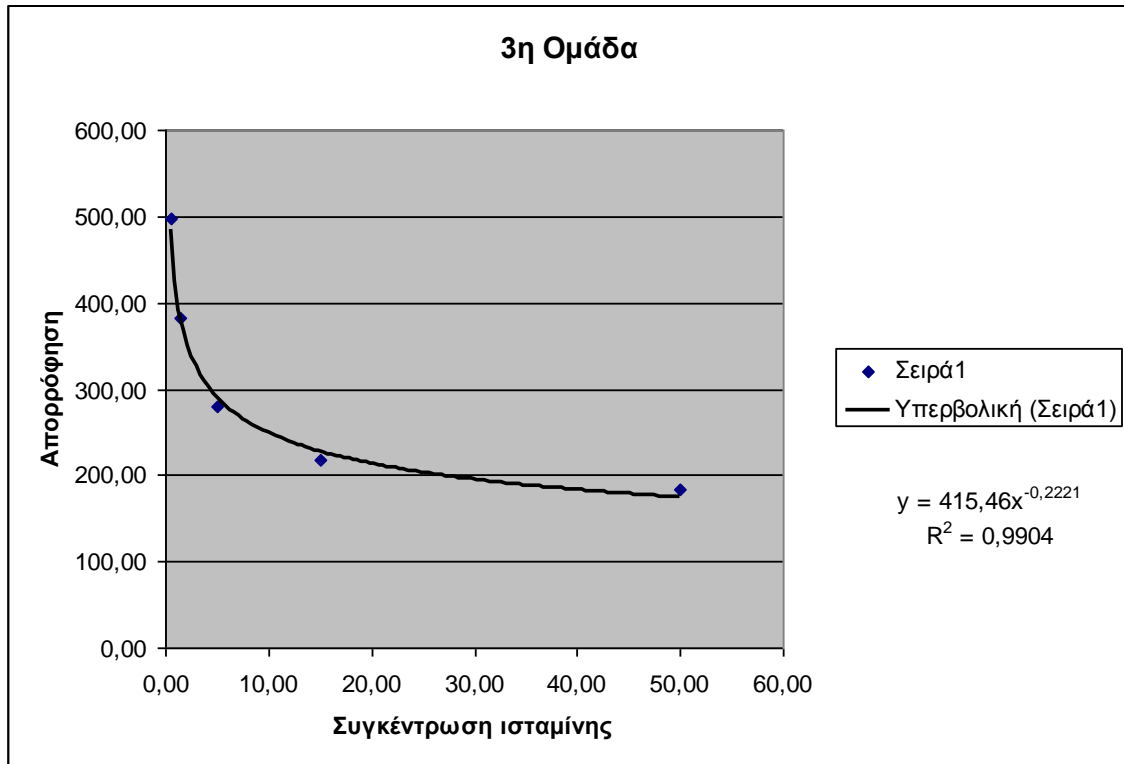


Διάγραμμα 5. Πρότυπη καμπύλη 2^{ης} ομάδας δειγμάτων.

Πίνακας 14. Συγκέντρωση ισταμίνης με βάση την πρότυπη καμπύλη (2^η ομάδα).

| Αριθμός δειγματος | Συγκέντρωση (x) |
|-------------------|-----------------|
| 12 | 0,19 |
| 13 | 0,28 |
| 14 | 0,18 |
| 15 | 0,24 |
| 16 | 0,94 |
| 17 | 0,20 |
| 18 | 0,23 |
| 19 | 0,16 |
| 20 | 0,33 |
| 21 | 0,25 |
| 22 | 0,33 |
| 23 | 0,29 |
| 24 | 0,21 |
| 25 | 0,18 |
| 26 | 0,14 |

Η τρίτη και τελευταία φάση του πειράματος έγινε στις 11 Οκτωβρίου 2013 και η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια. Η πρότυπη καμπύλη που προέκυψε φαίνεται στο διάγραμμα 6. Η εξίσωση που προέκυψε από την καμπύλη είναι η: $y = 415,46 x^{-0,2221}$ από την οποία βρίσκουμε το x για κάθε δείγμα μας (Πίνακας 15).



Διάγραμμα 6. Πρότυπη καμπύλη 3^{ης} ομάδας δειγμάτων.

Πίνακας 15. Συγκέντρωση ισταμίνης με βάση την πρότυπη καμπύλη (3^η ομάδα).

| Αριθμός δείγματος | Συγκέντρωση (x) |
|-------------------|-----------------|
| 27 | 0,24 |
| 28 | 0,27 |
| 29 | 13,66 |
| 30 | 0,26 |
| 31 | 0,32 |
| 32 | 0,28 |
| 33 | 0,27 |
| 34 | 2,80 |
| 35 | 0,26 |
| 36 | 0,24 |
| 37 | 0,24 |
| 38 | 0,38 |
| 39 | 0,87 |
| 40 | 0,42 |
| 41 | 0,24 |
| 42 | 0,24 |
| 43 | 0,40 |
| 44 | 0,23 |
| 45 | 0,37 |
| 46 | 0,31 |
| 47 | 0,33 |
| 48 | 0,39 |
| 49 | 0,30 |
| 50 | 0,35 |

Πολλαπλασιάζοντας την συγκέντρωση κάθε δείγματος, όπως προέκυψε από την πρότυπη καμπύλη και την αντίστοιχη εξίσωση, με τον συντελεστή αραίωσης 5.000 βρίσκουμε την τελική συγκέντρωση ισταμίνης (πίνακας 16). Επειδή το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης εμπορικής συσκευασίας είναι 2,5 mg/kg σε δείγματα που προέκυψαν συγκεντρώσεις μικρότερες των 2,5 mg/kg θεωρούμε ότι η ουσία δεν ανιχνεύτηκε (Δ.Α.).

Πίνακας 16. Τελική συγκέντρωση ισταμίνης και κατάταξη νωπότητας των δειγμάτων.

| a/a | Τελική συγκέντρωση ισταμίνης (mg/kg) | Κατάταξη νωπότητας | Παρατηρήσεις |
|-----|--------------------------------------|--------------------|--------------|
| 1 | 2,63 | A | |
| 2 | Δ.Α. | A | |
| 3 | Δ.Α. | A | |
| 4 | Δ.Α. | A | |
| 5 | 117,15 | A | |
| 6 | Δ.Α. | A | |
| 7 | Δ.Α. | A | |
| 8 | Δ.Α. | A | |
| 9 | Δ.Α. | A | |
| 10 | Δ.Α. | A | |
| 11 | Δ.Α. | A | |

| | | | |
|----|-------|---|--------------------------------------|
| 12 | Δ.Α. | A | |
| 13 | Δ.Α. | A | |
| 14 | Δ.Α. | A | |
| 15 | Δ.Α. | A | |
| 16 | 4,72 | A | Απουσία ακαμψίας |
| 17 | Δ.Α. | A | |
| 18 | Δ.Α. | A | Απουσία ακαμψίας |
| 19 | Δ.Α. | A | |
| 20 | Δ.Α. | A | |
| 21 | Δ.Α. | A | |
| 22 | Δ.Α. | A | |
| 23 | Δ.Α. | A | |
| 24 | Δ.Α. | A | |
| 25 | Δ.Α. | A | |
| 26 | Δ.Α. | A | Απουσία ακαμψίας |
| 27 | Δ.Α. | A | |
| 28 | Δ.Α. | A | |
| 29 | 68,32 | A | |
| 30 | Δ.Α. | A | |
| 31 | Δ.Α. | A | |
| 32 | Δ.Α. | B | |
| 33 | Δ.Α. | A | |
| 34 | 13,98 | A | |
| 35 | Δ.Α. | B | Εκκρίσεις έδρας |
| 36 | Δ.Α. | A | Εκκρίσεις έδρας |
| 37 | Δ.Α. | A | |
| 38 | Δ.Α. | A | |
| 39 | 4,35 | B | Μαλακή κοιλιά |
| 40 | Δ.Α. | B | Μαλακή κοιλιά, θολοί οφθαλμοί |
| 41 | Δ.Α. | B | Μαλακή κοιλιά, θολοί οφθαλμοί |
| 42 | Δ.Α. | B | Εκκρίσεις έδρας, απουσία ακαμψίας |
| 43 | Δ.Α. | B | Εκκρίσεις έδρας, απουσία ακαμψίας |
| 44 | Δ.Α. | A | Απουσία ακαμψίας |
| 45 | Δ.Α. | A | |
| 46 | Δ.Α. | A | |
| 47 | Δ.Α. | A | |
| 48 | Δ.Α. | A | |
| 49 | Δ.Α. | A | |
| 50 | Δ.Α. | A | |

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 17 σε σύνολο 50 δειγμάτων τα 44 περιείχαν λιγότερα από 2,5 mg/kg ισταμίνης, 3 περιείχαν 2,5-10 mg/kg, 1 περιείχε 10-50 mg/kg, 1 περιείχε 50-100 mg/kg, επίσης 1 100-200 mg/kg και κανένα περισσότερα από 200 mg/kg.

Πίνακας 17. Συγκέντρωση ισταμίνης στα δείγματα

| | Συγκέντρωση ισταμίνης (mg/Kg) | | | | | |
|-------------------|-------------------------------|--------|-------|--------|---------|------|
| | <2,5 | 2,5-10 | 10-50 | 50-100 | 100-200 | >200 |
| Αριθμός δειγμάτων | 44 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Ποσοστό % | 88% | 6% | 2% | 2% | 2% | 0% |

4.3 Συσχέτιση των αποτελεσμάτων με την νωπότητα των δειγμάτων

Από την μελέτη του πίνακα 16 όπου φαίνονται η κατάταξη νωπότητας και η τελική συγκέντρωση ισταμίνης στα δείγματα, μπορεί να παρατηρηθεί ότι τόσο το δείγμα 5 όσο και το δείγμα 29 ενώ έχουν καταταχθεί στην Α κατηγορία νωπότητας χωρίς παρατηρήσεις, εμφανίζουν συγκεντρώσεις 117,15 mg/kg και 68,32 mg/kg, αντίστοιχα, χωρίς να υπερβαίνουν το ανώτατο όριο της Ευρωπαϊκής Νομοθεσίας που είναι τα 200 mg/kg (mg/kg). Υπερβαίνουν όμως τα 50 mg/kg (mg/kg) που είναι το όριο που θέτει η F.D.A. των Η.Π.Α. Η ύπαρξη ισταμίνης μπορεί να αποδοθεί στην παραβίαση της αλυσίδας ψύξης των συγκεκριμένων δειγμάτων σε κάποιο σημείο της.

Στα δείγματα 35, 36 και 39-44 παρόλο που υπήρχαν παρατηρήσεις όπως μαλακή κοιλιά, εκκρίσεις έδρας, θολά μάτια κλπ και κατατάχθηκαν τα περισσότερα στην Β κατηγορία νωπότητας δεν διαπιστώθηκε παρουσία ισταμίνης.

5. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι η συγκέντρωση ισταμίνης στα δείγματα κυμάνθηκε από 2,5 – 117,15 mg/kg. Συγκεντρώσεις χαμηλότερες των 2,5 mg/kg θεωρούνται ως μηδενικές αφού αυτό είναι το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης μεθόδου. Το 6% των δειγμάτων εμφάνισε συγκεντρώσεις υψηλότερες των 10 mg/kg και δύο δείγματα (4%) υπερέβησαν τα 50 mg/kg και ένα από αυτά (2%) υπερέβη και τα 100 mg/kg. Οι ακριβείς συγκεντρώσεις ήταν 68,32 και 117,15 mg/kg. Αμφότερα κρίνονται ως μη συμμορφούμενα με βάση την νομοθεσία των Η.Π.Α. (όριο 50 mg/kg) αλλά δεν υπερβαίνουν το αντίστοιχο ευρωπαϊκό όριο των 200 mg/kg, οπότε δεν θεωρούνται μη συμμορφούμενα με βάση τον Κανονισμό (Ε.Ε.) αριθ. 2073/2005 όπως τροποποιήθηκε και ισχύει. Σε σχέση με τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών και δεδομένης της εποχής του έτους (καλοκαίρι) αλλά και των συνθηκών διάθεσης (υπαίθριες αγορές) τα αποτελέσματα της μελέτης μας χαρακτηρίζονται ικανοποιητικά.

Σε ανάλογες μελέτες που έχουν γίνει τόσο στην Ελλάδα όσο και σε άλλες χώρες με την χρήση της ELISA για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό της ισταμίνης σε δείγματα νωπών και μεταποιημένων ψαριών έχουν βρεθεί ενδεικτικά τα εξής:

Σε μελέτη που έγινε στην Θεσσαλία εξετάστηκαν 50 δείγματα νωπών, κατεψυγμένων, καπνιστών και κονσερβοποιημένων ψαριών που συλλέχθηκαν το πρώτο τετράμηνο του 2013 από την αγορά. Βρέθηκαν 4% >50 mg/kg και 2 % >100 mg/kg ποσοστά πολύ κοντά σε αυτά της δικής μας μελέτης (Μπλιθικιώτη 2013). Επίσης στην Ελλάδα (Βόρεια & Βορειοδυτική) σε 106 δείγματα νωπών, κατεψυγμένων, καπνιστών και κονσερβοποιημένων ψαριών από την αγορά βρέθηκαν 15% >50 mg/kg. Βέβαια τα περισσότερα από τα δείγματα που υπερέβαιναν τα 50 mg/kg δεν ήταν νωπά. Αν υπολογίζαμε μόνο τα νωπά το ποσοστό θα προσέγγιζε το 6% που είναι κοντά στα δικά μας αποτελέσματα (Βοζίκης και συν. 2008).

Στην Ιταλία, στην περιοχή της Puglia λήφθηκαν από το 2009 έως το 2011 216 νωπά δείγματα ψαριών από την αγορά και βρέθηκαν 12% >50 mg/kg και 6 % >100 mg/kg. Τα περισσότερα θετικά δείγματα αφορούσαν σε φρέσκο γαύρο. Το γεγονός ότι αυτή η μελέτη εμφανίζει τριπλάσια ποσοστά σε σχέση με την δική μας πιθανότατα οφείλεται στο διαφορετικό είδος ψαριών και στην μεγαλύτερη ευαισθησία που αυτό εμφανίζει στην θερμοκρασία λόγω μεγέθους (Muscarella et al 2012). Σε μελέτη που έγινε στο Περού λήφθηκαν από τις αγορές χονδρικής και λιανικής της Λίμα 38 δείγματα νωπών ψαριών (κολιός, παλαμίδα, μάχι-μάχι). Βρέθηκαν όλα <50 mg/kg (Gonzaga et al 2009). Στη Νότιο Αφρική στην περιοχή του Cape Town, σε 55 δείγματα νωπών ψαριών βρέθηκαν 6% >50 mg/kg και 1,8 >100 mg/kg. Και αυτά τα αποτελέσματα είναι πολύ κοντά στα δικά μας (Auerswald et al 2006).

Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών δείχνουν συγκεντρώσεις ισταμίνης >50 mg/kg από 0 έως 15% και >100 mg/kg από 0 έως 6%. Αν τα αποτελέσματα περιοριστούν μόνο σε νωπά δείγματα τότε τα παραπάνω ποσοστά περιορίζονται περίπου σε 6 και 3% αντίστοιχα που προσεγγίζουν αρκετά στα δικά μας αποτελέσματα.

Σε μελέτες που έγιναν με χρήση της HPLC βρέθηκαν ενδεικτικά τα εξής:

Σε μελέτη που έγινε στην Τουρκία εξετάστηκαν 59 δείγματα παραδοσιακών παρασκευασμάτων με ψάρια, από διάφορες χώρες της Ευρώπης. Βρέθηκαν 10,17% >50 mg/kg & 2 % >100 mg/kg. Το ποσοστό των δειγμάτων που υπερβαίνει τα 100 mg/kg συμπίπτει με αυτό της δικής μας μελέτης (Köse et al 2011). Στην Ισπανία, σε 45 δείγματα νωπών ψαριών (τόνος, παλαμίδα, σκουμπρί) από αγορές χονδρικής και λιανικής της Βαρκελώνης βρέθηκαν όλα <50 mg/kg αποτέλεσμα επίσης κοντά στα δικά μας (Lopez-Sabater et al 1994). Στην Τσεχία σε 99 δείγματα νωπών και κατεψυγμένων ψαριών από εστιατόρια βρέθηκαν 9,1% >50 mg/kg & 6,06% >100 mg/kg. Τα ποσοστά είναι διπλάσια σε σχέση με την δική μας μελέτη αλλά αφορά εστιατόρια και όχι αγορές (Bunka et al 2012). Στην Ταϊβάν, σε 61 δείγματα φιλέτων σκομβροειδών ψαριών από την αγορά της Ταϊπέι 6,5% >100 mg/kg, ποσοστό τριπλάσιο από το δικό μας, πιθανότατα λόγω των θερμών θαλασσών της περιοχής (Tsai et al 2004).

Παρατηρούμε ότι τα ποσοστά των δειγμάτων με συγκεντρώσεις ισταμίνης >50 mg/kg κυμαίνονται από 0 έως 15% και >100 mg/kg από 0 έως 6,5%. Εμφανίζεται μια εικόνα ανάλογη αυτής των μελετών με την χρήση ELISA και με τα δικά μας αποτελέσματα να βρίσκονται κοντά στους μέσους όρους των παραπάνω μελετών.

Όπως προαναφέρθηκε η θερμοκρασία συντήρησης των ψαριών είναι ο σημαντικότερος παράγοντας για την παραγωγή ή όχι ισταμίνης στην σάρκα τους. Η παρουσία λοιπόν ισταμίνης σε επίπεδα άνω των 50 mg/kg πιθανότατα οφείλεται σε διάσπαση της αλυσίδας ψύξης των ψαριών μία ή και περισσότερες φορές. Πράγματι μελέτες που έχουν γίνει για την διερεύνηση του ρόλου της θερμοκρασίας έχουν καταλήξει σε παρόμοια συμπεράσματα: Οι Jiang et al 2013 κατέληξαν ότι η θερμοκρασία επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και την παραγωγή ισταμίνης σε σκουμπρί κατά την συντήρησή του. Ο ρυθμός συσσώρευσης ισταμίνης ήταν υψηλός, όταν συντηρήθηκε στους 25 °C με την επικράτηση της χλωρίδας που παράγει ισταμίνη. Η αύξηση των βακτηρίων και η παραγωγή ισταμίνης επιβραδύνθηκε με τη μείωση της θερμοκρασίας συντήρησης. Η ανάπτυξη της *M. morgani* ήταν ο κύριος παράγοντας που συνέβαλε στην παραγωγή ισταμίνης σε σκουμπρί που συντηρήθηκε στους 15-25 °C η οποία υπερέβη τα 50 mg/kg (όριο τοξικότητας FDA) πριν ο πληθυσμός των βακτηρίων υπερβεί τα 10⁶ cfu / g (Jiang et al 2013). Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουν και οι Kim et al 2004 αφού επισημαίνουν ότι τα περισσότερα βακτήρια που παράγουν ισταμίνη είναι μεσόφιλα, και επομένως η θερμοκρασία είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξή τους και το σχηματισμό ισταμίνης. Η *M. morgani* είναι από τα σημαντικότερα βακτήρια στην παραγωγή ισταμίνης σε ψάρια και άλλα αλιεύματα. Η ανάπτυξή της οδηγεί άμεσα στην παραγωγή υψηλών επιπέδων ισταμίνης σε σκουμπρί όταν συντηρείται στους 25 °C. Σκουμπρί και μακρύπτερος τόνος και εμφανίζονται ως καλά υποστρώματα για την αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης από την *M. morgani* σε υψηλές θερμοκρασίες (>15°C). Η θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C) είναι η πιο ευνοϊκή προϋπόθεση για την παραγωγή ισταμίνης από την *M. morgani* (Kim et al 2002). Ψάρια που συντηρήθηκαν στους 32 °C απέκτησαν τοξικές συγκεντρώσεις ισταμίνης σε 6 ώρες, ενώ στους 21 °C σε 24 ώρες (Kim et al 2004). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Economou et al, 2007 η συγκέντρωση ισταμίνης ήταν σε τοξικά επίπεδα σε δείγματα τόνου, τα οποία εκτέθηκαν σε θερμοκρασίες 30°C για σύντομες περιόδους κάθε μέρα και για περισσότερο από 3 ημέρες. Λαμβάνοντας υπόψη την προστασία της δημόσιας υγείας, κατάλληλη αποθήκευση σε <4°C και σωστός χειρισμός των ψαριών είναι απαραίτητα για την καθυστέρηση του σχηματισμού της ισταμίνης και την πρόληψη των κρουσμάτων δηλητηρίασης από ισταμίνη (Economou et al 2007). Στις

περισσότερες περιπτώσεις δηλητηρίασης από ισταμίνη η περίοδος ανάμεσα στη σύλληψη των ψαριών και την ψύξη στους 0 °C παρατάθηκε περισσότερο από 12 ώρες ή η θερμοκρασία της σάρκας τους δεν έπεσε ποτέ κάτω από τους 20 °C. Συνηθισμένη κακή πρακτική της αλιείας με παραγάδια είναι να μένουν τα ψάρια έως και 20 ώρες σε νερά θερμοκρασίας ακόμα και 26 °C οπότε η ισταμίνη παράγεται πριν καν βρεθούν στο αλιευτικό σκάφος (Kim et al 2004).

Σύμφωνα με τους Jiang et al 2013 όταν το σκουμπρί συντηρείται στους 0 -4 °C , η αύξηση της χλωρίδας που παράγει ισταμίνη, όπως *M. morgani* και άλλα εντεροβακτηρίδια αναστέλλεται αποτελεσματικά, με αποτέλεσμα την καταστολή της συσσώρευσης της ισταμίνης. Ψυχρότροφα και ψυχρόφιλα βακτήρια θα μπορούσαν να παράξουν ισταμίνη σε χαμηλή θερμοκρασία, αλλά η συμβολή τους ήταν αμελητέα. Μολονότι η ισταμίνη συσσωρεύεται αργά σε χαμηλή θερμοκρασία, τα ψάρια αλλοιώνονται λόγω μικροβιακής ανάπτυξης πριν την παραγωγή τοξικών επιπέδων ισταμίνης (Jiang et al 2013). Οι Torido et al 2012 διαπίστωσαν ότι η παρουσία στα ψάρια ψυχρόφιλης χλωρίδας, ικανής να παράγει ισταμίνη μπορεί να οδηγήσει σε υψηλές συγκεντρώσεις ισταμίνης, χωρίς άλλες αλλοιώσεις. Πράγματι, σε τόνο που συντηρήθηκε στους 0-8 °C η ισταμίνη έφτασε σε τοξικά επίπεδα πριν την εμφάνιση αλλοιώσεων στα ψάρια (Torido et al 2012). Σε άλλη μελέτη τα δείγματα τόνου που συντηρήθηκαν στους 0, 8 & 20 °C. Τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 0 °C και στους 20 °C απορρίφθηκαν οργανοληπτικά πριν τα επίπεδα ισταμίνης ξεπεράσουν τα 50 mg/kg. Αντίθετα, στα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 8 °C η ισταμίνη έφτασε σε επίπεδα πάνω από 1000 mg/kg πριν τα δείγματα απορριφθούν οργανοληπτικά. Έτσι τα χαρακτηριστικά νωπότητας (εμφάνιση κλπ) δεν είναι πάντα καλό κριτήριο για την ασφάλεια των ψαριών ως προς την ισταμίνη (Lopez - Sabater et al 1995)

Τα τελευταία συμπεράσματα εξηγούν σε μεγάλο βαθμό στην αδυναμία συσχέτισης ανάμεσα στην νωπότητα των δειγμάτων και την συγκέντρωση ισταμίνης που διαπιστώσαμε και στην παρούσα έρευνα. Πράγματι ανάλογα με την θερμοκρασία συντήρησης, τις τυχόν παραβιάσεις της αλυσίδας ψύξης και το είδος της χλωρίδας που επικρατεί (ικανότητα παραγωγής ισταμίνης) μπορεί ψάρια που χαρακτηρίζονται νωπά να έχουν υψηλά επίπεδα ισταμίνης ή και το αντίστροφο.

Σε μελλοντικές θα μπορούσαν να ληφθούν δείγματα νωπών ψαριών (σκομβροειδών ή μη) που ευθύνονται συχνά για κρούσματα δηλητηρίασης από ισταμίνη όπως ο γαύρος και η σαρδέλα που είναι και ιδιαίτερα δημοφιλή στη χώρα μας. Θα μπορούσε επίσης να συγκριθεί η περιεκτικότητα σε ισταμίνη σε δείγματα των παραπάνω ψαριών από υπαίθριες αγορές με εκείνη από ιχθυοπωλεία. Τέλος καλό θα ήταν να υπάρχει η δυνατότητα (τεχνική και οικονομική) επαλήθευσης των αποτελεσμάτων της ELISA με HPLC στο σύνολο τους ή τουλάχιστον των θετικών σε ισταμίνη.

Συμπερασματικά, σε σύνολο 50 δειγμάτων νωπού κολιού που λήφθηκαν από υπαίθριες αγορές 2 υπερέβαιναν τα 50 mg/kg (Αμερικανική νομοθεσία) και 1 από αυτά τα 100 mg/kg. Κανένα δεν ήταν μη συμμορφούμενο με βάση την Ευρωπαϊκή νομοθεσία. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων με ανάλογες μελέτες στην Ελλάδα και το εξωτερικό δείχνει ότι στην Ελλάδα τα ποσοστά ψαριών με ισταμίνη που υπερβαίνει τα 50 mg/kg είναι χαμηλά σε σχέση με άλλες χώρες.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A. ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

1. **Ababouch L.** (2014), *Good Practices in Fisheries and Aquaculture* in Encyclopedia of Food Safety, Motarjemi Y. (Ed.) Vol.4, pp. 159-167.
2. **Arino A., Beltran J. A., Herrera A., Roncales P.,** (2005), *Fish* in Encyclopedia of Human Nutrition Second Edition, Caballero B., Allen L., Prentice A. (Ed.) pp. 247-256.
3. **Auerswald L., Morren C., Lopata L. A.,** (2006) “*Histamine levels in seventeen species of fresh and processed South African seafood*” **Food Chemistry** 98: 231–239.
4. **Brink B., Daming C., Joosten H., Huis in’t Velt J.,** (1990) “*Occurrence and formation of biologically active amines in foods*” **International Journal of Food Microbiology**, 11: 73-84.
5. **Bunka F., Budinský P., Zimáková B., Merhaut M., Flasarová R., Pachlová V., Kubán V., Bunková L.,** (2013) “*Biogenic amines occurrence in fish meat sampled from restaurants in region of Czech Republic*”, **Food Control** 31: 49-52.
6. **Cinquina A.L., Longo F., Cali A., De Santis L., Bacceliere R., Cozzani R.,** (2004) *Validation and comparison of analytical methods for determination of histamine in tuna fish samples*” **Journal of Chromatography A**, 1032: 79-85.
7. **Codex Alimentarius,** (2009) Code of Practice for Fish and Fishery Products, First edition, WHO, FAO, Rome 2009.
8. **Collette, B. B.** (2003) “*Family Scombridae Rafinesque 1815 — mackerels, tunas, and bonitos*” **Calif. Acad. Sci. Annotated Check lists of Fishes** No. 19, 28.
9. **De Paola A., Toyofuku H.,** (2014) *Safety of Foods and beverages: Seafood*, in Encyclopedia of Food Safety, Motarjemi Y. (Ed.) Vol.: 260-267.
10. **De Smet S.** (2012) “*Meat, poultry, and fish composition: Strategies for optimizing human intake of essential nutrients*” **Animal Frontiers** Vol. 2, No 4: 10-16.
11. **Economou V , Brett M M , Papadopoulou C , Frillingos S, Nichols T,** (2007) “*Changes in histamine and microbiological analyses in fresh and frozen tuna muscle during temperature abuse*” **Food Additives and Contaminants**, 24(8): 820–832.
12. **Erim B.F.** (2013) “*Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples*” **Trends in analytical chemistry**, 52: 239-247.

13. **European Food Safety Authority** (2014) “*The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012*”, **EFSA Journal**, 12:2, 3547.
14. **Ferran M, Yébenes M**, (2006). “*Flushing associated with scombroid fish poisoning*”, **Dermatology Online Journal**, 12 (6). Retrieved from: <http://escholarship.org/uc/item/68h2w3wb-16/05/2014>.
15. **Fletcher G. C., Summers G., Van Veqhel P. W. C.**, (1998), “*Levels of histamine and histamine-producing bacteria in smoked fish from New Zealand markets*”, **Journal of Food Protection**, 61:1064–1070.
16. **Food and Agriculture Organization Corporate Document Repository**, (1995) Quality changes in fresh fish, ch.4 Chemical composition, pp. 1-12.
17. **Food and Agriculture Organization Corporate Document Repository** (2001), The Composition of Fish, pp. 1-8.
18. **Food and Agriculture Organization** (1983) Species Catalogue, Vol.2 Scombrids of the World.
19. **Food and Drug Administration** (2011) Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance Fourth Edition.
20. **Ghaly A. E., Dave D., Budge S., Brooks M. S.**, (2010) “*Fish Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: Review*” **American Journal of Applied Sciences** 7: 859-877.
21. **Gonzaka E. V., Lescano G. A., Huama A. A., Salmo G., Mulanovich N.**, (2009) “*Histamine Levels in Fish from Markets in Lima, Peru*”, **Journal of Food Protection**, Vol. 72, No. 5: 1112–1115.
22. **Guizani N, -Busaidy M A, -Belushi I M, Mothershaw A, Rahman M S**, (2005) “*The effect of storage temperature on histamine production and the freshness of yellowfin tuna (Thunnus albacares)*” **Food Research International** 38: 215–222.
23. **Hungerford M. J.** (2010) “*Scombroid Poisoning: A review*” **Toxicon**, 56: 231-243
24. **Institute Of Medicine of the National Academies**, (2006), Seafood Choices: Balancing Benefits and Risks.
25. **Jiang Q. Q., Dai Z. Y., Zhou T., Wu J. J., Bu J. Z., Zheng T. L.**, (2013) “*Histamine production and bacterial growth in mackerel (Pneumatophorus japonicus) during storage*” **Journal of Food Biochemistry** 37: 246-253.
26. **Kim S H, Price R J, Morrissey M T, Field K G, Wei C I, An H**, (2002) “*Histamine Production by Morganella morganii in Mackerel, Albacore, Mahi-mahi, and Salmon at Various Storage Temperatures*” **Journal of Food Science**, Vol. 67, 4: 1522-1528.

27. **Kim S. H., Wei C., Clemens R., An H.,** (2004). “*Review: Histamine Accumulation in Sea foods and Its Control to Prevent Outbreaks of Scombroid Poisoning*”, **Journal of Aquatic Food Product Technology**, 13:4, 81-100.
28. **Kose S., Kaklikkaya N., Koral S., Tufan B., Buruk K., Aydin F.,** (2011) “*Commercial test kits and the determination of histamine in traditional (ethnic) fish products – evaluation against EU accepted HPLC method*” **Food Chemistry**, 125: 1490-1497.
29. **Kris-Etherton P M, Harris S W, Appel L J,** (2002). “*Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease*”, **Circulation** 106: 2747-2757.
30. **Landete J. M., De Las Rivas B., Marcobal A., Munoz R.,** (2008) “*Updated Molecular Knowledge about Histamine Biosynthesis by Bacteria*” **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 48: 697–714.
31. **Lehane L., Olley J.,** (2000) “*Histamine fish poisoning revisited*” **International Journal of Food Microbiology** 58: 1–37.
32. **Leuchner R., Hristova A., Robinson T. Hugas M.,** (2013) “*The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) database in support of risk analysis of biogenic amines in food*”, **Journal of Food Composition and Analysis**, 29: 37-42.
33. **Lopez-Sabater E., Rodriguez-Jerez J., Hernandez-Herrero M., Roig-Sagues A., Mora-Ventura M.,** (1995) “*Sensory quality and histamine formation during controlled decomposition of tuna (*Thunnus thynnus*)*”, **Journal of Food Protection**, 59 (2): 167–174.
34. **Lopez-Sabater E. I., Rodriguez-Jerez J. J., Hernandez-Herrero M., Mora-Ventura M. T.,** (1996) “*Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area*”, **International Journal of Food Microbiology**, 28: 411-418.
35. **Mainz L., Novak N.,** (2007), “*Histamine and histamine intolerance*”, **The American Journal of Clinical Nutrition**, 85: 1185-1196.
36. **Muscarella M., Iammarino M., Centonze D, Palermo C.** (2005) “*Measurement of Histamine in Seafood by HPLC, CE, and ELISA: Comparison of Three Techniques*”, **Veterinary Research Communications**, 29 (Suppl. 2): 343–346.
37. **Muscarella M., Lo Magro S., Campaniello M., Armentano A., Stacchini P.,** (2013), “*Survey of histamine levels in fresh fish and fish products collected in Puglia (Italy) by ELISA and HPLC with fluorimetric detection*”, **Food Control** 31: 211-217.
38. **Onal A.** (2007) “*A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods*” **Food Chemistry**, 103: 1475-1486.

39. **Prester L.** (2011) “*Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review*” **Food Additives and Contaminants Part A**, (28), 11: 1547-1560.
40. **Rapid Alert System for Food and Feed**, (2013) “*2012 Annual Report*” Publications office of the European Union, Luxemburg.
41. **Rawles D., Flick J. G., Martin E. R.**, (1996) “*Biogenic amines in fish and shellfish*”, **Advances in Food and Nutrition Research**, Vol. 39: 329-365.
42. **Rodriguez R.P.M., Carneiro da Silva C., Feijo da Silva B.M., Junior C.A.C., Mano B.S.**, (2014) “*Bioactive Amines: Aspects of Quality and Safety in Food*” **Food and Nutrition Sciences**, 5: 138-146.
43. **Shalaby A.**, (1996) “*Significance of biogenic amines to food safety and human health*” **Food Research International** Vol. 29, 7: 675-690.
44. **Silla Santos M.H.**, (1996) “*Biogenic amines: their importance in foods*” **International Journal of Food Microbiology**, 29: 213-231.
45. **Sivertsvik M., Jeksrud W.K., Rosnes J. T.**, (2002) “*A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety*” **International Journal of Food Science and Technology**, 37: 107-127.
46. **Torido Y, Takahashi, Takashi Kuda H, Kimura B**, (2012) “*Analysis of the growth of histamine-producing bacteria and histamine accumulation in fish during storage at low temperatures*» **Food Control** 2: 174-77.
47. **Tsai Y H, Kung H F, Lee G T, Lin C Y, Hwang D F.** (2004). “*Histamine related hygiene qualities and bacteria found in popular commercial scombroid fish fillets in Taiwan*”, **Journal of Food Protection**. 67: 407–412.
48. **Vosikis V., Papageorgopoulou A. , Economou V., Frillingos S., Papadopoulou C.** (2008), “*Survey of the histamine content in fish samples randomly selected from the Greek retail market*”, **Food Additives and Contaminants: Part B**, Vol. 1, No. 2: 122–129.

B. ΕΛΛΗΝΙΚΗ

1. **Αρβανιτογιάννης Ι., Σάνδρου Δ., Κούρτης Λ.**, (2001) Ασφάλεια τροφίμων, Εφαρμογή της ανάλυσης επικινδυνότητας και κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP) στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών, University Studio Press, Θεσσαλονίκη pp. 191-195.
2. **Βαρελτζής Κυριάκος** (1999) Ποιοτικός έλεγχος και τεχνολογία αλευμάτων, Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία pp. 22-23, 60-61, 130-131.

3. **Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων**, (2002) Οδηγός Υγιεινής για τους πωλητές τροφίμων σε λαϊκές αγορές.
4. **ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2406/96 ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ** της 26ης Νοεμβρίου 1996 περί καθορισμού κοινών προδιαγραφών εμπορίας ορισμένων αλιευτικών προϊόντων L 334/1.
5. **Μπλιθικιώτη Σ.** (2013), «*Εκτίμηση των επιπέδων ισταμίνης σε δείγματα ψαριών στην περιοχή της Θεσσαλίας- Συσχέτιση με τη Δημόσια Υγεία*», Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Σχολή Επιστημών Υγείας Τμήμα Ιατρικής Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «*Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή*».
6. **Πεξάρá Α.** (2013) Σημειώσεις Υγιεινής Αλιευμάτων, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Σχολή Επιστημών Υγείας Τμήμα Ιατρικής Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «*Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή*».
7. **Υπουργείο Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος Κύπρου**, Κτηνιατρικές Υπηρεσίες (2009) «Υγιεινή των αλιευμάτων στα αλιευτικά σκάφη» Γραφείο Τύπου και Πληροφοριών, Κυπριακή Δημοκρατία.
8. **Υπουργείο Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος Κύπρου**, Τμήμα Αλιείας και Θαλασσίων Ερευνών (2011) «Τα 100 σημαντικότερα είδη ψαριών των Κυπριακών θαλασσών» Γραφείο Τύπου και Πληροφοριών, Κυπριακή Δημοκρατία.

Γ. ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

1. http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temphq_4841258519039582756.xml&outtype=html-11/03/2014
2. <http://www.fao.org/fishery/species/3277/en-11/03/2014>
3. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1-12/03/2014>
4. [http://www.moa.gov.cy/moa/vs/vs.nsf/All/BD7BED32FDBBCB26C22576BF002E6733/\\$file/kritiria%20freskotitas%20alievmaton.pdf-12/03/2014](http://www.moa.gov.cy/moa/vs/vs.nsf/All/BD7BED32FDBBCB26C22576BF002E6733/$file/kritiria%20freskotitas%20alievmaton.pdf-12/03/2014)
5. <http://circ.ahajournals.org/content/106/21/2747-26/03/2014>
6. http://www.fishwatch.gov/seafood_profiles/species/mackerel/species_pages/pacific_mackerel.htm-27/03/2014
7. <http://www.fao.org/docrep/v7180e/v7180e05.htm-31/03/2014>
8. <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5916e/x5916e01.htm-01/04/2014>
9. <http://www.fao.org/docrep/011/a1553e/a1553e00.htm-01/04/2014>

