



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



**«Εκτίμηση των επιπέδων ισταμίνης σε δείγματα ψαριών  
στην περιοχή της Θεσσαλίας-  
Συσχέτιση με τη Δημόσια Υγεία»**

της

ΜΠΛΙΘΙΚΙΩΤΗ ΣΤΕΦΑΝΙΑΣ του ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ  
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ ΤΕΙ ΛΑΡΙΣΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2013

## Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Χατζηχριστοδούλου Χρήστος (Επιβλέπων)
2. Κρικέλης Βασίλειος
3. Πλακοκέφαλος Ηλίας

## Ευχαριστίες

*Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης και Καθηγητή του τμήματος Ιατρικής κ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστο, όσον αφορά στην σωστή διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής μελέτης. Θερμές ευχαριστίες στην κ. Ελένη Μαλισσιόβα, διδάκτορα του τμήματος Ιατρικής για την πολύτιμη βοήθεια της καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξη τους σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.*

# Εκτίμηση των επιπέδων ισταμίνης σε δείγματα ψαριών στην περιοχή της Θεσσαλίας- Συσχέτιση με τη Δημόσια Υγεία

## Περίληψη

Τα ψάρια αποτελούν μια βασική τροφή μεγάλης διατροφικής αξίας και για το λόγο αυτό η κατανάλωση τους είναι αυξημένη σε όλο τον κόσμο. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός των επιπέδων ισταμίνης σε δείγματα ψαριών από τους νομούς της Θεσσαλίας με τη μέθοδο της ELISA και η εξαγωγή συμπερασμάτων για την ασφάλεια του καταναλωτή.

Η ισταμίνη προέρχεται από την αποκαρβοξυλίωση της ιστοδίνης από Gram + και Gram – βακτήρια. Η παρουσία της σε τρόφιμα μειώνει την ποιότητά τους και μπορεί να προκαλέσει δηλητηρίαση. Πιο συγκεκριμένα όσο αναφορά τα ψάρια, κατανάλωση ψαριών με υψηλά επίπεδα ισταμίνης οδηγεί σε δηλητηρίαση γνωστή ως «σκομβροειδή δηλητηρίαση». Τα είδη ψαριών που κυρίως ενοχοποιούνται για τη συγκεκριμένη δηλητηρίαση είναι τα είδη της οικογένειας Scombridae καθώς και άλλα είδη πλούσια σε ιστοδίνη. Διάφορες τεχνικές χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ισταμίνης σε δείγματα ιχθύων, με επικρατέστερη την ELISA για διαλογή δειγμάτων, ενώ ως μέθοδος αναφοράς χρησιμοποιείται η HPLC

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ELISA 50 δείγματα φρέσκων και επεξεργασμένων ψαριών που ανήκουν στα είδη: τόνος, σκουμπρί, σαρδέλα, αντζούγια, γαύρος, σολομός και ρέγγα. Τα αποτελέσματα της πειραματικής μας διαδικασίας δώσανε 2 δείγματα στα οποία η ποσότητα ισταμίνης ήταν ανώτερη των επιτρεπών ορίων. Ένα δείγμα φρέσκου γαύρου και ένα δείγμα σαρδέλας σε κονσέρβα. Οι συνθήκες συντήρησης επεξηγούν τα υψηλά ποσοστά ισταμίνης. Σε συγκριτικές μελέτες που έγιναν και με άλλες έρευνες καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι στην Ελλάδα τα ποσοστά ψαριών με ισταμίνη που υπερβαίνει τα επιτρεπτά όρια είναι χαμηλά σε σχέση με άλλες χώρες..

### Λέξεις - κλειδιά:

ισταμίνη, σκομβροειδή ψάρια, ασφάλεια τροφίμων, σκομβροειδής δηλητηρίαση, ELISA

## **Estimation of histamine levels in fish samples in Thessaly – Correlation with public health**

### **Abstract**

Fish is a staple food of high nutritional value and for that reason its consumption is increasing worldwide. The purpose of this study is to determine the levels of histamine in samples derived from the region of Thessaly with the ELISA method and to draw conclusions about the safety of the consumers.

Histamine is produced from histidine's decarboxylation by Gram + and Gram – bacteria. Its presence in foods reduces their quality and may causes allergic reaction. Specifically, the consumption of fishes with high levels of histamine leads to poisoning referred as “scombroid poisoning”. The fish species which are accused for this poisoning are the fishes of the Scombridae family and other species rich in histidine. Various techniques are used for the determination of histamine in fish samples; ELISA is the predominant for screening samples while HPLC is used as a reference method.

In the present study, 50 samples of fresh and επεξεργασμένο fishes were analyzed with the method of ELISA. The samples were from the species: tuna, mackerel, salmon, sardine, anchovy and herring. The results of the experimental procedure were 2 samples with histamine at a higher level than the maximum permissible limit: one sample of fresh anchovy and one sample of canned sardine. The conditions of preservation are responsible for the high levels of histamine. A comparison between our study and other studies shows that in Greece there is a lower percentage of fishes with high histamine levels than in other countries

### **Keywords:**

Histamine, scombroid fishes, food safety, scombroid poisoning, ELISA

# Περιεχόμενα

A. Ευχαριστίες	i
B. Κατάσταση πινάκων	ii
Γ. Κατάσταση διαγραμμάτων - εικόνων	iii
<b>1. Εισαγωγή</b>	<b>1</b>
1.1 Βιογενείς αμίνες και ισταμίνη	1
1.1.1. Επίδραση της ισταμίνης	1
1.1.2. Ισταμίνη και τρόφιμα	3
1.2 Αλιεύματα	4
1.2.1 Συμβολή των αλιευμάτων στη διατροφή του ανθρώπου	4
1.2.2. Χημική σύσταση αλιευμάτων	6
1.2.3. Επεξεργασίες στα αλιεύματα	7
1.3 Ασφάλεια Αλιευμάτων - Αιτιολογικοί Παράγοντες	9
1.3.1 Ισταμίνη και αλιεύματα	10
1.3.2 Σχηματισμός ισταμίνης στα αλιεύματα	12
1.3.3 Συνέπειες της ισταμίνης στην υγεία	13
1.3.4 Επιδημιολογικά δεδομένα	15
1.3.5 Νομοθεσία	17
1.3.6 Επιτήρηση επιπέδων ισταμίνης	17
1.4 Αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού ισταμίνης	19
1.4.1 ELISA	20
<b>2. Μεθοδολογία</b>	<b>23</b>
2.1 Δειγματοληψία	23
2.2 Προσδιορισμός ισταμίνης	23
2.2.1. Επιλογή εμπορικής συσκευασίας ELISA	23
2.2.2. Υλικά και όργανα	23
2.2.3 Αναλυτική Τεχνική	24
2.3. Στατιστική Επεξεργασία	27

2.4. Χρήση RASFF	27
<b>3. Αποτελέσματα</b>	<b>28</b>
3.1. Περιγραφή δείγματος	28
3.2 Αναλυτικά αποτελέσματα	30
3.3. Συσχέτιση αποτελεσμάτων με τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων	35
3.4. Αποτελέσματα βάσης δεδομένων RASFF	38
<b>4. Συζήτηση - Συμπεράσματα</b>	<b>45</b>
<b>5. Βιβλιογραφία</b>	<b>47</b>
<b>6. Παράρτημα</b>	<b>52</b>

## **B. Κατάσταση πινάκων**

Πίνακας 1: Συνέπειες της ισταμίνης ανάλογα με την συγκέντρωση της στο πλάσμα του αίματος (ng/ml)	2
Πίνακας 2: Τρόφιμα στα οποία ανιχνεύεται ισταμίνη	3
Πίνακας 3: Ποσότητες ισταμίνης στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα	3
Πίνακας 4: Ιχθύες οικογένειας Scrombridae	11
Πίνακας 5: Εμπορικές συσκευασίες ELISA	22
Πίνακας 6: Περιγραφή πειραματικής διαδικασίας	25
Πίνακας 7: Περιγραφή δειγμάτων	28
Πίνακας 8: Δείγματα ψαριών	29
Πίνακας 9: Συγκέντρωση ισταμίνης στα δείγματα ψαριών (φάση 1 <sup>η</sup> )	31
Πίνακας 10: Συγκέντρωση ισταμίνης στα δείγματα ψαριών (φάση 2 <sup>η</sup> )	32
Πίνακας 11: Συγκέντρωση ισταμίνης στα δείγματα ψαριών (φάση 3 <sup>η</sup> )	33
Πίνακας 12: Τελική συγκέντρωση ισταμίνης ανά δείγμα	34
Πίνακας 13: Συγκεντρωτικά στοιχεία για την τελική συγκέντρωση ισταμίνης των δειγμάτων	35
Πίνακας 14: Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	38
Πίνακας 15: Αποτελέσματα παρουσίας ισταμίνης σε δείγματα ψαριών για το 2013 στην Ευρώπη	38
Πίνακας 16: Αποτελέσματα παρουσίας ισταμίνης σε δείγματα ψαριών για το 2012 στην Ευρώπη	40
Πίνακας 17: Αποτελέσματα παρουσίας ισταμίνης σε δείγματα ψαριών για το 2011 στην Ευρώπη	41



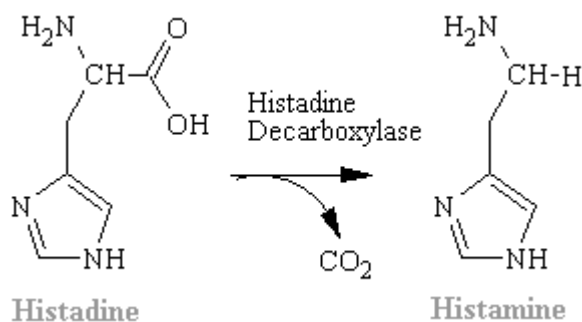
## Γ. Κατάσταση διαγραμμάτων - εικόνων

Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη της 1 <sup>ης</sup> φάσης του πειράματος	31
Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη της 2 <sup>ης</sup> φάσης του πειράματος	32
Διάγραμμα 3: Πρότυπη καμπύλη της 3 <sup>ης</sup> φάσης του πειράματος	33
Διάγραμμα 4: Δείγματα ψαριών με ισταμίνη στην Ευρώπη το 2013	39
Διάγραμμα 5: Δείγματα ψαριών με ισταμίνη στην Ευρώπη το 2012	41
Διάγραμμα 6: Δείγματα ψαριών με ισταμίνη στην Ευρώπη το 2011	42
Διάγραμμα 7: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τη διατία 2011-2013 παρουσίας ισταμίνης σε δείγματα ψαριών ανά χώρα	43
Διάγραμμα 8: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τη διατία 2011-2013 παρουσίας ισταμίνης σε δείγματα ψαριών ανά είδος	43
Διάγραμμα 9: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τη διατία 2011-2013 παρουσίας ισταμίνης σε δείγματα ψαριών ανά μορφή μεταποίησης	44
Εικόνα 1: Μετατροπή ιστιδίνης σε ισταμίνη	1
Εικόνα 2: Περίληψη των συμπτωμάτων της διαμεσολάβησης της ισταμίνης	2
Εικόνα 3: Μέση κατανάλωση ψαριού κατ' άτομο στον κόσμο	5
Εικόνα 4: Ψάρια που ανήκουν στην οικογένεια Scombridae	10
Εικόνα 5: Βακτήρια ( <i>Clostridium perfringens</i> και <i>Morganella morganii</i> ) που συμμετέχουν στην αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης	13
Εικόνα 6: Διάγραμμα περιπτώσεων ασθενών στη Χαβάη	16
Εικόνα 7: Περιγραφή της διαδικασίας της ELISA σε κάθε φάση	21
Εικόνα 8: Παράδειγμα έρευνας στο RASFF portal	27

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Βιογενείς αμίνες -ισταμίνη

Οι βιογενείς αμίνες είναι μη-πτητικές αλειφατικές, αλεικυκλικές και ετεροκυκλικές οργανικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που παράγονται από βακτήρια μέσω της αποκαρβοξυλίωσης των ελεύθερων αμινοξέων (Bulushi et al., 2009). Η απομάκρυνση της άλφα-καρβοξυλικής ομάδας από τα αμινοξέα οδηγεί στην αντίστοιχη παραγωγή βιογενών αμινών. Τα ονόματα πολλών βιογενών αμινών αντιστοιχούν στα ονόματα των αμινοξέων από τα οποία προέρχονται: ισταμίνη από ιστιδίνη (Εικόνα, 1), τυραμίνη από τυροσίνη, βήτα-φαινυλαιθυλαμίνη από φαινυλαλανίνη, τρυπταμίνη από τρυπτοφάνη (Bodmer et al., 1999).



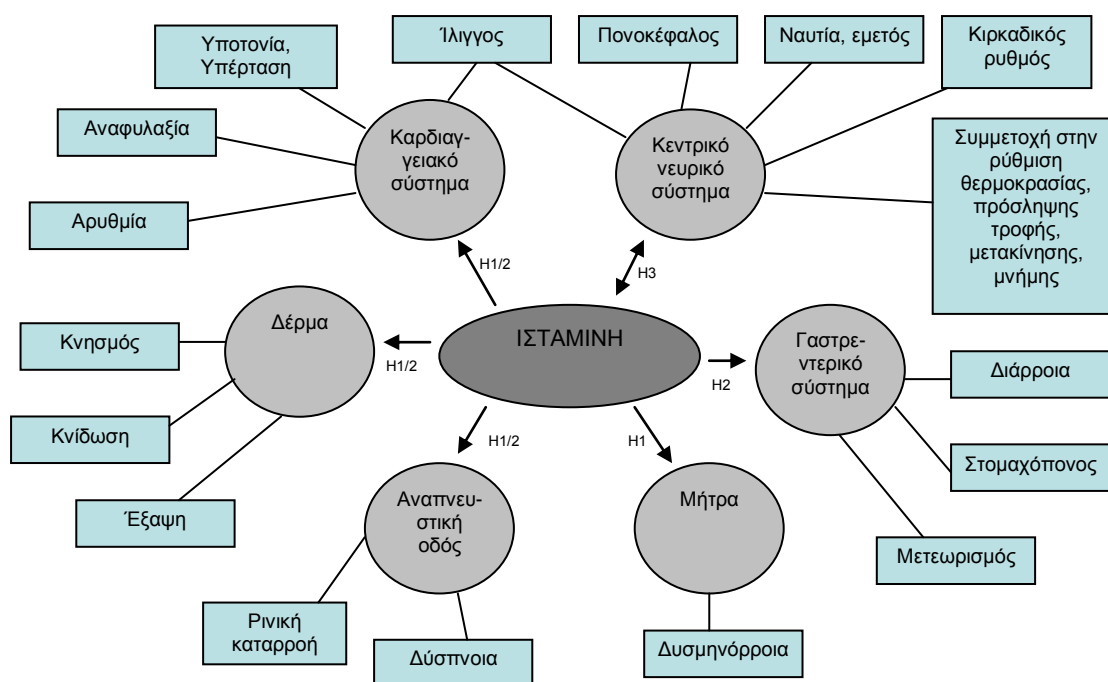
Εικόνα 1: Μετατροπή ιστιδίνης σε ισταμίνη (fda, 2013)

Η ισταμίνη (2 - [4-ιμιδαζολυλ] αιθυλαμίνη) ανακαλύφθηκε το 1910 από τους Dale και Laidlaw και ταυτοποιήθηκε ως μεσολαβητής αναφυλακτικών αντιδράσεων το 1932 (Steinhoff et al., 2004).

### 1.1.1. Επίδραση της ισταμίνης

Η ισταμίνη είναι ένας ισχυρός μεσολαβητής σε πολλές βιολογικές αντιδράσεις, δεδομένου ότι επιδρά μέσω σύνδεσης με τους 4 υποδοχείς ισταμίνης H1R, H2R, H3R και H4R στα κύτταρα στόχους σε διάφορους ιστούς Η ισταμίνη στον ανθρώπινο οργανισμό προκαλεί σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων, αγγειοδιαστολή, αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και της έκκρισης βλέννας. Ακόμα είναι υπεύθυνη για ταχυκαρδίες, μεταβολές της αρτηριακής πίεσης και αρρυθμίες. Η παρουσία ισταμίνης διεγείρει την έκκριση γαστρικού οξέος και την αλγοδεκτικότητα των νευρικών ινών. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι παίζει διάφορους ρόλους στη νευροδιαβίβαση, την ανοσορυθμιστική δράση, την αιμοποίηση, την επούλωση των

πληγών και τον κερκαδικό ρυθμό. Τέλος, σημαντικός είναι ο ρόλος της στον ισταμινό-επαγόμενο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην αγγειογένεση σε περιπτώσεις ογκογενέσεων και εντερικών ισχαιμιών (Maintz and Novak, 2007). Συνοπτικά οι επιδράσεις της ισταμίνης στον οργανισμό παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.



**Εικόνα 2:** Περίληψη των συμπτωμάτων της διαμεσολάβησης της ισταμίνης (Maintz and Novak, 2007)

Οι επιπτώσεις της ισταμίνης επηρεάζονται από την ποσότητα της, όπως αναλυτικά παρουσιάζεται στον Πίνακα 1 σύμφωνα με τους Maintz και Novak.

**Πίνακας 1:** Συνέπειες της ισταμίνης ανάλογα με την συγκέντρωσή της στο πλάσμα του αίματος (ng/ml)

Ισταμίνη	Κλινικό αποτέλεσμα
0-1	Αναφορά
1-2	Αύξηση εκκρίσεως γαστρικού οξέος Αύξηση καρδιακού ρυθμού
3-5	Ταχυκαρδία, πονοκέφαλος, κνίδωση, κνησμός, έξαψη
6-8	Μείωση αρτηριακής πίεσης
7-12	Βρογχοσπασμός
~ 100	Καρδιακή ανακοπή

## 1.1.2. Ισταμίνη και τρόφιμα

Τρόφιμα που ενδέχεται να περιέχουν υψηλά επίπεδα βιογενών αμινών (Πίνακας 2) είναι τα ψάρια και τα αλιευτικά προϊόντα, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, το κρέας και τα προϊόντα του, λαχανικά που έχουν υποστεί ζύμωση, τα προϊόντα σόγιας και τα αλκοολούχα ποτά, όπως το κρασί και η μύρα (Onal, 2007).

Η παρουσία υψηλών ποσοστών ισταμίνης στα τρόφιμα επηρεάζει την ποιότητά τους και για το λόγο αυτό ο προσδιορισμός της χρησιμοποιείται σαν δείκτης ποιότητας. Τα φρέσκα και σωστά αποθηκευμένα ή επεξεργασμένα τρόφιμα και ποτά έχουν χαμηλή περιεκτικότητα ισταμίνης. Ανάμεσα σε τρόφιμα της ίδιας κατηγορίας, τα προϊόντα με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ισταμίνη είναι σαφώς καλύτερης ποιότητας, δεδομένου ότι η ισταμίνη μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα τροφικής δυσανεξίας ή ακόμη και τροφική δηλητηρίαση (Sattler et al., 1999).

**Πίνακας 2:** Τρόφιμα στα οποία ανιχνεύεται ισταμίνη (Steinhoff et al., 2004)

<u>Φυτικά</u>	<u>Ζωικά</u>	<u>Άλλα</u>
Εσπεριδοειδή	Ψάρι	Πρόσθετα
Παπάγια	Οστρακόδερμα	Γλυκόριζα
Φράουλες	Χοιρινό	Μπαχαρικά
Ξηροί καρποί	Ασπράδι αυγού	
Φυστίκια		
Τομάτες		
Σπανάκι		
Σοκολάτα		

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν καλά παραδείγματα για να επιδείξουν την ανεπιθύμητη αύξηση ισταμίνης κατά τη διάρκεια της μη κατάλληλης επεξεργασίας τροφίμων (Πίνακας 3).

**Πίνακας 3:** Ποσότητες ισταμίνης στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (Bodmer et al., 1999)

<u>Προϊόν</u>	<u>Ποσότητα ισταμίνης (ppm)</u>
Φρέσκο γάλα	< 0,3
Παστεριωμένο γάλα	0,3 – 0,7
Γάλα μακράς διάρκειας	ως 0,8
Κρέμα γάλακτος	ως 7
Γιαούρτι	ως 13
Τυρί	ως 2500

Ενώ το φρέσκο γάλα συνήθως περιλαμβάνει πολύ χαμηλά επίπεδα ισταμίνης, το εμπορικά διαθέσιμο παστεριωμένο ή μακράς διάρκειας γάλα εμφανίζει ελαφρώς υψηλότερα ποσοστά. Κατά τη ζύμωση του γάλακτος, συχνά συμβαίνει σημαντική

άνοδος της ποσότητας ισταμίνης, που οδηγεί σε ποσότητες ως και 7 ppm στην κρέμα γάλακτος και ακόμα υψηλότερες στο γιαούρτι. Τέλος, κατά την παραγωγή τυριών συχνά παρατηρείται μια σημαντική αύξηση της ισταμίνης που οδηγεί σε επίπεδα έως και 2500 ppm στο ώριμο τυρί (Bodmer et al., 1999).

Ανάλογα περιστατικά παρατηρούνται κατά την παραγωγή κρασιού. Ο φρέσκος χυμός σταφυλιού περιέχει αμελητέες ποσότητες ισταμίνης της τάξεως του 0,01 ppm ενώ σε μερικά κρασιά ανιχνεύθηκαν ποσότητες ως και 20 ppm. Ποσότητες ισταμίνης 3,63 mg/l ανιχνεύθηκαν στα γαλλικά κρασιά, 2,19 mg/l στα ιταλικά κρασιά και 5.02 mg/l στα ισπανικά κρασιά. Στο κρασί βακτήρια όπως τα *Oenococcus oeni* και *Lactobacillus hilgardi* (Lucas et al., 2005).

Αντίστοιχα στο κρέας η παραγωγή ισταμίνης οφείλεται τόσο σε σταφυλόκοκκους όσο και σε εντεροβακτήρια. (Martin et al., 2006) Σε έρευνες που γίνανε οι συγκεντρώσεις ισταμίνης κυμαίνονταν από 0 έως 514 mg/kg, εξαρτώμενες κυρίως από τον κατασκευαστή παρά από τον τύπο του αλλαντικού. Παρόμοιες ποσότητες ισταμίνης παρατηρήθηκαν σε λουκάνικα που παρήχθησαν στην Ισπανία και τη Φινλανδία. Υψηλά επίπεδα, γύρω στο 400 mg/kg ανιχνεύθηκαν σε μακράς ωρίμανσης αυστριακά λουκάνικα (Paravergou et al., 2012).

Τα ψάρια έχουν ενοχοποιηθεί ως ένα από τα συχνότερα τρόφιμα που εμπλέκονται με τροφιμογενή νοσήματα λόγω παρουσίας ισταμίνης.

## **1.2 Αλιεύματα**

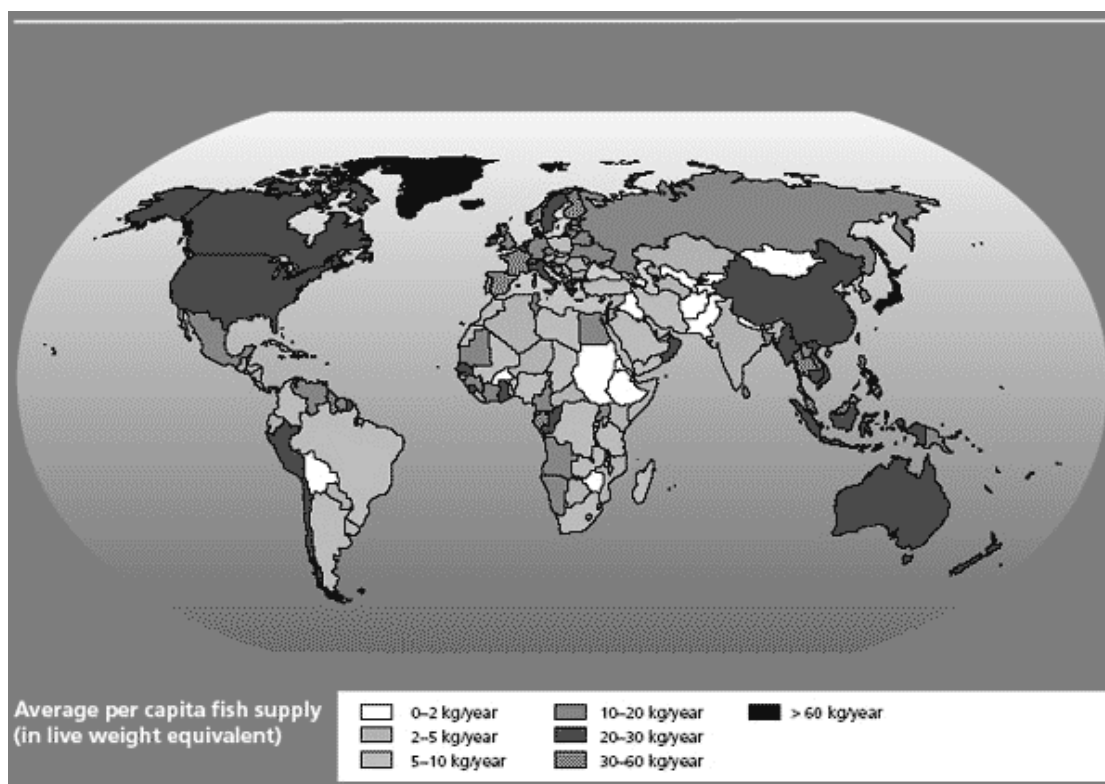
Η ιστορία των ψαριών ξεκινάει πολύ πριν κάνει την εμφάνισή του ο άνθρωπος στη γη. Η παρουσία τους χρονολογείται πολύ πριν την εμφάνιση όλων των άλλων σπονδυλωτών.

Με τον όρο «ψάρι» εννοείται κάθε μορφής σπονδυλωτό που είναι προσαρμοσμένο ώστε να ζει μόνο στο νερό (αλμυρό, γλυκό, υφάλμυρο) Είναι η μόνη ομάδα σπονδυλωτών που μπορεί να ζει εξολοκλήρου στο νερό. Ανήκουνε στη συνομοταξία των χορδωτών και σήμερα υπάρχουν περισσότερα από 33.000 γνωστά είδη ψαριών τα περισσότερα από τα οποία ανήκουνε στους οστειχθύες (Νεοφύτου, 1997).

### **1.2.1 Συμβολή των αλιευμάτων στη διατροφή του ανθρώπου**

Η κατανάλωση ψαριού έχει υποστεί σημαντικές μεταβολές κατά τις περασμένες δεκαετίες. Η κατά κεφαλή κατανάλωση ψαριού παγκοσμίως αυξήθηκε σταδιακά από 9,9 κιλά τη δεκαετία του '60 σε 11,5 κιλά το '70, 12,5 και 14,4 κιλά το '80 και το '90 αντίστοιχα, φτάνοντας τα 16,4 κιλά το 2005. Η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στην Ανατολική Ασία (π.χ Κίνα) καθώς και περιοχή της βόρειας Αφρικής. Οι παρεκκλίσεις στην κατανάλωση ψαριού ανάμεσα σε διάφορες περιοχές οφείλεται σε παραδόσεις και συνήθειες, στην διαθεσιμότητα ψαριού και άλλων τροφών, στις τιμές

και τα κοινωνικά και οικονομικά δεδομένα. Επιπρόσθετα η κατανάλωση είναι υψηλότερη σε παράκτιες περιοχές (Εικόνα 3)(greenfacts, 2008).



Εικόνα 3: Μέση κατανάλωση ψαριού κατ' άτομο στον κόσμο (FAO – Fisheries, 2008)

Η αλιεία και οι υδατοκαλλιέργειες ήταν υπεύθυνες, το 2009, για τον εφοδιασμό του πληθυσμού με 145 χιλιάδες τόνους τροφής. Η παγκόσμια κατανάλωση ψαριού έφτασε στα 17 κιλά ανά άτομο. (bbc, 2011)

Σύμφωνα με το faostat στην Ελλάδα το 2009 καταναλώθηκαν 25.425 τόνοι ψαριού το 2008 και το 2007 κάπου στους 25.424 τόνους, το 2006 22.464 και το 2005 18.779 τόνοι ψαριού (faostat, 2010).

Το βασικότερο χαρακτηριστικό του ψαριού ως εδώδιμο προϊόν είναι το είδος λίπους που περιέχει και το οποίο είναι πολυακόρεστο, προεξάρχοντων των ω-3 λιπαρών οξέων. Έρευνες δείξαν ότι αν και Εσκιμώοι καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες λιπών τα κρούσματα αθηροσκλήρυνσης είναι ελάχιστα. Ανάλυση των διατροφικών τους συνηθειών έδειξαν πως η κατανάλωση λιπών που προέρχονται από τα ψάρια ξεπερνάει το 20% της ημερήσιας ενεργειακής κάλυψης. Στη συνέχεια έρευνες απέδειξαν την αντιθρομβωτική δράση των ω-3 λιπαρών οξέων των ψαριών. Ειδικότερα το EPA (εικοσιπεντανοϊκό οξύ) και το DHA (εικοσιδιπεντανοϊκό οξύ), που είναι τα πιο σημαντικά ω-3 λιπαρά οξέα, βρέθηκε πως μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στο αίμα, ενώ παράλληλα αυξάνουν τα επίπεδα της καλής χοληστερόλης HDL. Όταν αυτά τα λιπαρά οξέα μεταβολιστούν, δίνουν

προϊόντα, όπως οι προστιγλαδίνες, οι θρομβοξάνες και οι λευκοτριένες, που έχουν ισχυρή αντιαθηρωματογόνο δράση (iatronet, 2004).

Σε έρευνα που έγινε σε ασθενείς με πρόσφατο ιστορικό εμφράγματος, η αυξημένη κατανάλωση ψαριού μείωσε τους θανάτους κατά 20%. Φαίνεται, λοιπόν, πως ένας από τους πιο αποτελεσματικούς τρόπους μείωσης των καρδιοπαθειών είναι η αύξηση στο διαιτολόγιό μας των ω-3 λιπαρών οξέων. Αυτά τα λιπαρά οξέα κρίνονται επίσης αναγκαία για την ανάπτυξη και την καλή λειτουργία της όρασης του δέρματος καθώς και του εγκεφάλου. Όλα τα ψάρια δεν έχουν την ίδια περιεκτικότητα σε λίπος. Η περιεκτικότητά τους εξαρτάται από το είδος, από το χρόνο και τον τόπο αλίευσης (π.χ. ο σολομός των παγωμένων νερών του Ατλαντικού αναπτύσσει περισσότερο λίπος από σολομούς θερμότερων θαλασσών). Η σαρδέλα, για παράδειγμα, όταν αλιεύεται το Μάρτιο έχει 2% λίπος, ενώ το Σεπτέμβριο 23% (incardiology, 2012).

Ακόμα, η κατανάλωση σημαντικής ποσότητας ψαριού κατά την παιδική ηλικία μειώνει τις πιθανότητες εμφάνισης αλλεργιών μετά τον 12 χρόνο της ζωής. Οι πιθανότητες για έκζεμα μειώνονται κατά 22% και για αλλεργική ρινίτιδα κατά 26% σύμφωνα με ερευνητές από το Ινστιτούτο Καρολίνσκα της Στοκχόλμης που εξέτασαν το διαιτολόγιο 3.258 παιδιών ηλικίας 1, 2, 4, 8 και 12 ετών. Φαίνεται πως η κατανάλωση ψαριού δύο με τρεις φορές το μήνα, για τα βρέφη, είναι αρκετή για να μειώσει σημαντικά τον κίνδυνο (Magnusson et al., 2013).

### **1.2.2. Χημική σύσταση αλιευμάτων**

Τα βασικά χημικά συστατικά των ψαριών είναι οι πρωτεΐνες, τα λίπη, οι υδατάνθρακες, οι βιταμίνες και τα ανόργανα συστατικά όπως αναλυτικά παρουσιάζονται παρακάτω.

#### **Πρωτεΐνες**

Ο μυϊκός ιστός ψαριών περιέχει μεγάλη περιεκτικότητα πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες της σάρκας τους είναι υψηλής βιολογικής αξίας και περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα σε ισορροπημένη αναλογία, ενώ παρουσιάζουν εξαιρετική ευκολία στην πέψη. Η περιεκτικότητα σε πρωτεϊνικό άζωτο του μυϊκού ιστού των ψαριών κυμαίνεται μεταξύ 2 και 3% (Belitz et al., 2006). Οι μυϊκές πρωτεΐνες διακρίνονται σε τρεις βασικές ομάδες: τις σαρκοπλασμικές (20-30% του συνόλου των πρωτεϊνών: σφαιρίνες όπως η μυοσφαρίνη, ένζυμα, νουκλεοπρωτεΐνες, μικροαλβουμίνες), τις μυοϊνικές (70-80%: ακτίνη, μυοσίνη, τροπομυοσίνη, τροπονίνες, ακτινίνες κ.α.) και τις πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού (κολλαγόνο και ελαστίνη). Συγκριτικά με τα εδάδιμα μυοσυστήματα χερσαίων ζώων, οι μύες των τελεόστεων ιχθύων περιέχουν μικρότερο ποσοστό πρωτεϊνών συνδετικού ιστού (2-3% έναντι του ποσοστού 16-28%) (Haard, 1995).

## **Υδατάνθρακες**

Τα ψάρια έχουν πολύ μικρή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (0,04-1,69%), δεδομένου ότι ο οργανισμός τους επενδύει ενεργειακά κυρίως στα λίπη και κατά δεύτερο λόγο στις πρωτεΐνες. Η περιεκτικότητά τους σε υδατάνθρακες ποικίλει ανάλογα με τη διατροφή, την ηλικία και το είδος. Ο κυριότερος υδατάνθρακας που απαντάται στους ιχθύες είναι το γλυκογόνο (Παπαναστασίου, 1990).

## **Λίπη**

Η περιεκτικότητα σε λίπη παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις, ανάλογα με το είδος και την εποχή του έτους. Οι λιπαρές ουσίες στη σάρκα των θαλάσσιων τελεόστων ιχθύων ανέρχονται σε ποσοστό 0,1-25%. Τα λίπη των ψαριών αποτελούνται από εστέρες λιπαρών οξέων (γλυκερίδια), εστέρες της στερόλης και από ένα ασαπωνοποίητο τμήμα, αποτελούμενο από ανώτερες αλκοόλες, στερόλες, αιθέρες και υδρογονάνθρακες. Στη σύνθεση των λιπών των ψαριών απαντάται ένας μεγάλος αριθμός λιπαρών οξέων. Οι ιχθύες αποτελούν σημαντική πηγή ω-3-πολυενικών οξέων (Παπαναστασίου, 1990).

## **Ανόργανα συστατικά**

Η κατανάλωση ψαριών προμηθεύει τον άνθρωπο με ουσιώδη μικροστοιχεία. Η σάρκα τους, σε σύγκριση με εκείνη των χερσαίων ζώων, περιέχει εκατονταπλάσια ποσότητα ιωδίου, πενταπλάσια έως δεκαπλάσια ποσότητα φθορίου, πολύ μεγαλύτερη ποσότητα σεληνίου, αντίστοιχη ποσότητα χαλκού και μικρότερη σιδήρου. Επιπλέον, περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα ασβεστίου σε σύγκριση με το κρέας των θηλαστικών και αρκετή ποσότητα φωσφόρου (Lall, 1995).

## **Βιταμίνες**

Τα ψάρια περιέχουν αρκετές ποσότητες βιταμινών, κυρίως λιποδιαλυτών. Το λίπος τους αποτελεί σημαντική πηγή των λιποδιαλυτών βιταμινών Α και D. Σε σημαντικές περιεκτικότητες απαντώνται εξάλλου και οι βιταμίνες Ε (τοκοφερόλη) και Κ καθώς επίσης και οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες (Belitz et al., 2006).

### **1.2.3. Επεξεργασίες στα αλιεύματα**

Εκτός των φρέσκων ψαριών που πωλούνται κατευθείαν μετά την αλιεία τους υπό συνθήκες ψύξης, τα ψάρια μπορεί να υποστούν επεξεργασία, ώστε να διατηρηθούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Συγκεκριμένα οι συχνότερες επεξεργασίες στα αλιεύματα περιλαμβάνουν τα ακόλουθα:

#### **Κονσερβοποίηση**

Η διαδικασία της κονσερβοποίησης είναι μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους επεξεργασίας των τροφίμων με σκοπό την συντήρησή τους.



Κονσερβοποίηση ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία το ψάρι θερμαίνεται εντός κλειστών δοχείων με σκοπό την καταστροφή των μικροοργανισμών, που θα μπορούσαν να προκαλέσουν κάποια αλλοίωση στο τρόφιμο και βλάβη στην υγεία των καταναλωτών. Παράλληλα, τα τρόφιμα με αυτόν τον τρόπο προφυλάσσονται για από περαιτέρω επιμόλυνση με αποκλεισμό του αέρα. Κατά την κονσερβοποίηση το κυριότερο μέλημα των παρασκευαστών είναι η αποστείρωση. (FAO, 2005)

Ορισμένοι μικροοργανισμοί είναι δυνατόν να επιβιώσουν, αλλά πρέπει να παραμείνουν σε αδρανή μορφή. Δηλαδή, κατά την κονσερβοποίηση επιδιώκεται «εμπορική αποστείρωση» και όχι ολοκληρωτική αποστείρωση, που θα κατέστρεφε τα θρεπτικά συστατικά του τροφίμου και θα αλλοίωνε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του (foodbites, 2012).

### **Καπνισμός**

Η κάπνιση των ψαριών αποτελεί μια από τις παλαιότερες μεθόδους συντήρησής τους. Με μια τέτοια έντονη επεξεργασία, οι ιχθύες μπορούσαν να διατηρηθούν για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα. Σήμερα, η κάπνιση έχει ως κύριο σκοπό την παραγωγή εκλεκτών προϊόντων με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, όπως είναι το άρωμα, η γεύση και το χρώμα και δευτερευόντως τη μακρόχρονη συντήρησή τους. Τα κυριότερα προϊόντα καπνιστών ιχθύων, ολόκληρων ή σε φιλέτα που διακινούνται στον κόσμο είναι: σολομός, πέστροφα, τόνος, ρέγγες, χέλι, σκουμπρί, σαρδέλα, μπακαλιάρος κ.α. (seafood, 2007)

### **Κατάψυξη**

Η χρήση της ψύξης για τη συντήρηση των ψαριών συναντάται πρώτη φορά στους προϊστορικούς χρόνους, όπου οι άνθρωποι χρησιμοποιούσαν το χιόνι και τον πάγο για να τα συντηρήσουν. Κατά τη δεκαετία του '30 τα κατεψυγμένα τρόφιμα άρχισαν να πωλούνται εμπορικά μετά από την ανακάλυψη μιας μεθόδου ταχείας κατάψυξης.

Η κατάψυξη καθυστερεί την καταστροφή των τροφίμων και τα διατηρεί ασφαλή, παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και επιβραδύνοντας την ενζυμική δραστηριότητα που προκαλεί την αλλοίωση των τροφίμων. Καθώς το νερό στα τρόφιμα μετασχηματίζεται σε κρυστάλλους πάγου κατά τη διάρκεια της κατάψυξης, δεν είναι πλέον διαθέσιμο στους μικροοργανισμούς που το χρειάζονται για την ανάπτυξή τους. Δεν υπάρχει σχεδόν καμία απώλεια βιταμίνης και ανόργανων αλάτων στα κατεψυγμένα ψάρια, επειδή η πρωτεΐνη, οι βιταμίνες A και D και τα ανόργανα άλατα δεν επηρεάζονται από την ψύξη (eufic, 2002).

Πριν καταψυχθεί το ψάρι θα πρέπει να έχει πλυθεί να έχει καθαριστεί από τα εντόσθια και τα λέπια, καθώς και σε περιπτώσεις μεγάλων ψαριών να έχει τεμαχιστεί. Στη συνέχεια το ψάρι συσκευάζεται σε κατάλληλες συσκευασίες για να τοποθετηθεί στον καταψύκτη (nchfp, 2005)

### **1.3 Ασφάλεια Αλιευμάτων - Αιτιολογικοί Παράγοντες**

Τα αλιεύματα ανήκουν στην κατηγορία των ευπαθών τροφίμων. Λόγω υψηλού τους pH, η ταχύτητα αλλοίωσης τους είναι μεγάλη, με συνέπεια τη μείωση της θρεπτικής τους αξίας. Στα ψάρια, μετά το θάνατο τους, αρχίζουν να αναπτύσσονται μικρόβια που βρίσκονται κυρίως στην επιφάνεια, τον εντερικό σωλήνα ή τα βράγχια τους. Τα σημαντικότερα προβλήματα που μπορούν να προκληθούν εξαιτίας της δράσης μικροβίων είναι:

- Τροφικές δηλητηριάσεις κυρίως σε άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, αν τα ψάρια δε συντηρηθούν σωστά. Αυτές οφείλονται σε δράση παθογόνων μικροοργανισμών, όπως *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Shigella sp.*, *Vibrio sp.*, *Listeria sp.*

- Παραγωγή δυσάρεστης γεύσης και οσμής, μείωση της ελαστικότητας τους και άλλες αλλοιώσεις που χαρακτηρίζουν τα μη φρέσκα ψάρια. Οφείλονται στη δράση μικροοργανισμών, όπως μικρόκοκκοι, εντερόκοκκοι, ψευδομονάδες και εντεροβακτήρια

- Παρουσία υψηλών ποσοτήτων υδραργύρου. Ο υδράργυρος βρίσκεται στο νερό και όταν προσληφθεί από τα ψάρια δεν αποβάλλεται, αλλά συγκεντρώνεται στα όργανά τους. Τα ψάρια μεγάλης ηλικίας και μεγάλου μεγέθους μπορεί να περιέχουν μεγάλες ποσότητες υδραργύρου, παραπάνω από 1 ppm, που είναι επικίνδυνες για τον ανθρώπινο οργανισμό.

- Σκομβροειδής δηλητηρίαση: Η οποία οφείλεται στην παραγωγή ισταμίνης λόγω κακής συντήρησης. Η σκομβροειδής δηλητηρίαση παρουσιάζεται στην συνέχεια της εργασίας αναλυτικά. (nutrimed, 2011)

Ακόμα έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου η κατανάλωση ψαριού είναι υπεύθυνη για την πρόκληση αλλεργιών. Η τροφική αλλεργία στο ψάρι είναι σπάνια στη χώρα μας, σε σύγκριση, παραδείγματος χάρη, με τη συχνότητα αλλεργίας σε άλλες τροφές όπως το γάλα και το αβγό. Ο επιπολασμός της αλλεργίας στο ψάρι υπολογίζεται σε λιγότερο από 0,5% του γενικού πληθυσμού, αριθμός που μεταφράζεται σε συχνότητα περίπου ενός ατόμου που εμφανίζει αλλεργία ανά 1000 (παιδιά και ενήλικες) (allergiologiko, 2013).

Ο αιτιολογικός παράγοντας της αλλεργίας στο ψάρι είναι η παρβαλβουμίνη, μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στο μυϊκό ιστό όλων των ψαριών, σε διαφορετική για κάθε είδος ποσότητα. Η παρβαλβουμίνη διατηρεί την ικανότητά της να προκαλέσει αντίδραση και μετά την έκθεσή της σε ψηλές θερμοκρασίες. Έτσι, τα ψάρια παραμένουν αλλεργιογόνα και μετά το μαγείρεμα. Σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να υπάρχει ευαισθησία και σε άλλα αλλεργιογόνα του ψαριού όπως το κολλαγόνο και η αλδεϋδική δεϋδρογενάση. (ippokrates-ygeia-diatrofi, 2011)

### 1.3.1 Ισταμίνη και αλιεύματα

Ο όρος «σκομβροειδής δηλητηρίαση» προέρχεται από το είδος των ψαριών (οικογένεια Scombridae) που πρώτα ενοχοποιήθηκαν για δηλητηρίαση από ισταμίνη, όπως ο τόνος και το σκουμπρί (scombrid) (Πίνακας 4). Η οικογένεια Scombridae είναι η οικογένεια των κολιών, τόνων και παλαμίδας, και ως εκ τούτου περιλαμβάνει πολλά από τα πιο σημαντικά και γνωστά εδώδιμα ψάρια. Η οικογένεια αποτελείται από 51 είδη σε 15 γένη και δύο υποοικογένειες. Όλα τα είδη είναι στην υποοικογένεια Scombrinae, εκτός από την πεταλούδα kingfish - το οποίο είναι το μοναδικό μέλος της υποοικογένειας Gasterochismatinae (Orrell et al., 2006).

Τα ψάρια αυτής της οικογένειας έχουν δύο ραχιαία πτερύγια, καθώς και μια σειρά μικρών πτερυγίων πίσω από το οπίσθιο ραχιαίο πτερύγιο και το πρωκτικό πτερύγιο. Το ουραίο πτερύγιο είναι έντονα διχασμένη και άκαμπτο, με μια λεπτή, με ραβδώσεις, βάση. Τα μήκη των ειδών κυμαίνονται από τα 20 cm (7,9 in) του σκουμπριού στο 4,58 m (15,0 ft) που καταγράφονται για τον τεράστιο τόνου του Ατλαντικού. Είναι γενικά αρπακτικά του ανοικτού ωκεανού, και βρίσκονται σε όλο τον κόσμο σε τροπικά και εύκρατα νερά. Είναι σε θέση να αναπτύξουν αξιοσημείωτη ταχύτητα, λόγω του εξαιρετικά βελτιωμένου σώματος και των πτερύγια. Ορισμένα μέλη της οικογένειας, ιδίως των τόνων, ξεχωρίζουν γιατί είναι μερικώς ενδόθερμα, ένα χαρακτηριστικό που τους βοηθά να διατηρούν υψηλή ταχύτητα και δραστηριότητα (Block et al., 1992)

Το κοινό χαρακτηριστικό των ψαριών αυτών είναι τα υψηλά επίπεδα της ελεύθερης ιστιδίνης στους ιστούς των μυών τους (Ruiz-Capillas and Moral, 2004). Είναι πλέον γνωστό, ότι και άλλα είδη ψαριών, επίσης, εμπλέκονται σε δηλητηρίαση από ισταμίνη, όπως η σαρδέλα (*Sardinella* spp.), ο γαύρος (*Engraulis* spp.), η ρέγγα (*Clupea* spp), ο ξιφίας (*Makaira* spp) και ο σολομός (*Salmo* spp.). Τα περισσότερα από αυτά τα είδη των ψαριών είναι πλούσια σε ελεύθερη ιστιδίνη με το σολομό και το ξιφία να αποτελούν εξαιρέσεις (Antoine et al, 2002).



**Εικόνα 4:** Ψάρια που ανήκουν στην οικογένεια Scombridae (www.oceanlight.com)

**Πίνακας 4:** Ιχθύες οικογένειας Scrombridae (www.fishbase.org)

<b>Οικογένεια</b>	<b>Είδος</b>	<b>Αγγλική Ονομασία</b>
Scombridae	<u>Acanthocybium solandri</u>	Wahoo
Scombridae	<u>Auxis rochei rochei</u>	Bullet tuna
Scombridae	<u>Auxis thazard thazard</u>	Frigate tuna
Scombridae	<u>Euthynnus affinis</u>	Kawakawa
Scombridae	<u>Euthynnus alletteratus</u>	Little tunny
Scombridae	<u>Grammatorcynus bicarinatus</u>	Shark mackerel
Scombridae	<u>Katsuwonus pelamis</u>	Skipjack tuna
Scombridae	<u>Rastrelliger brachysoma</u>	Short mackerel
Scombridae	<u>Rastrelliger faughni</u>	Island mackerel
Scombridae	<u>Rastrelliger kanagurta</u>	Indian mackerel
Scombridae	<u>Sarda chiliensis chiliensis</u>	Eastern Pacific bonito
Scombridae	<u>Sarda chiliensis lineolata</u>	Pacific bonito
Scombridae	<u>Sarda sarda</u>	Atlantic bonito
Scombridae	<u>Scomber australasicus</u>	Blue mackerel
Scombridae	<u>Scomber colias</u>	Atlantic chub mackerel
Scombridae	<u>Scomber japonicus</u>	Chub mackerel
Scombridae	<u>Scomber scombrus</u>	Atlantic mackerel
Scombridae	<u>Scomberomorus brasiliensis</u>	Serra Spanish mackerel
Scombridae	<u>Scomberomorus cavalla</u>	King mackerel
Scombridae	<u>Scomberomorus commerson</u>	Narrow-barred Spanish mackerel
Scombridae	<u>Scomberomorus concolor</u>	Monterey Spanish mackerel
Scombridae	<u>Scomberomorus guttatus</u>	Indo-Pacific king mackerel
Scombridae	<u>Scomberomorus lineolatus</u>	Streaked seerfish
Scombridae	<u>Scomberomorus maculatus</u>	Atlantic Spanish mackerel
Scombridae	<u>Scomberomorus munroi</u>	Australian spotted mackerel
Scombridae	<u>Scomberomorus niphonius</u>	Japanese Spanish mackerel
Scombridae	<u>Scomberomorus plurilineatus</u>	Kanadi kingfish
Scombridae	<u>Scomberomorus queenslandicus</u>	Queensland school mackerel

Scombridae	<u>Scomberomorus semifasciatus</u>	Broad-barred king mackerel
Scombridae	<u>Scomberomorus sierra</u>	Pacific sierra
Scombridae	<u>Scomberomorus sinensis</u>	Chinese seerfish
Scombridae	<u>Scomberomorus tritor</u>	West African Spanish mackerel
Scombridae	<u>Thunnus alalunga</u>	Albacore
Scombridae	<u>Thunnus albacares</u>	Yellowfin tuna
Scombridae	<u>Thunnus atlanticus</u>	Blackfin tuna
Scombridae	<u>Thunnus maccoyii</u>	Southern bluefin tuna
Scombridae	<u>Thunnus obesus</u>	Bigeye tuna
Scombridae	<u>Thunnus orientalis</u>	Pacific bluefin tuna
Scombridae	<u>Thunnus thynnus</u>	Atlantic bluefin tuna
Scombridae	<u>Thunnus tonggol</u>	Longtail tuna

### 1.3.2 Σχηματισμός ισταμίνης στα αλιεύματα

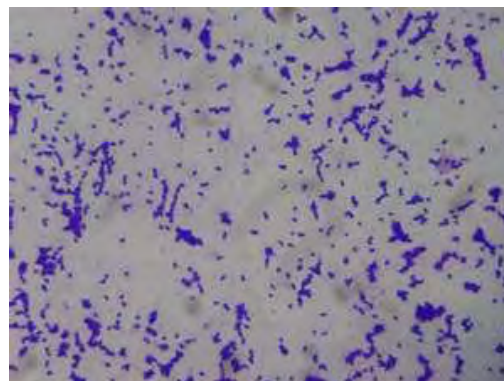
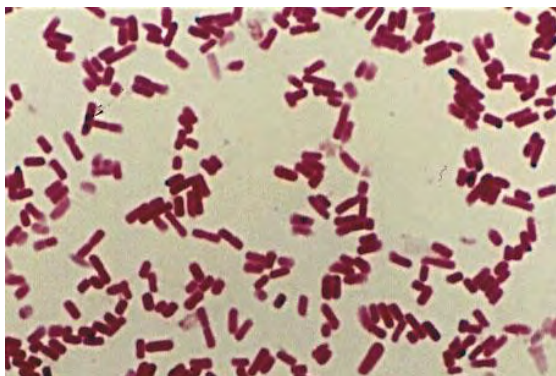
Ο σχηματισμός της ισταμίνης στα ψάρια και στα οστρακοειδή προέρχεται κυρίως από την αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης από εξωγενείς αποκαρβοξυλάσες (HDC) που απελευθερώνονται από τη μικροχλωρίδα (Gram-αρνητικών βακτήρια όπως τα *Bacillus*, *Clostridium*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella morganii*, *Proteus*, *Enterobacteriaceae* και *Enterococcus*) (Onal, 2007). Οι περισσότεροι από αυτούς τους οργανισμούς είναι μεσόφιλοι. Αν και μόνο τα *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* και *Hafnia alvei* έχουν απομονωθεί από ψάρια που έχουν θεωρηθεί υπεύθυνα για δηλητηρίαση από ισταμίνη, μια ποικιλία άλλων βακτηριακών ειδών ικανών να παράγουν ισταμίνη έχουν ταυτοποιηθεί σε ψάρια (Bulushi et al., 2009).

Ανάμεσα σε αυτά βρίσκονται τα εντερικά *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia fonticola*, *Serratia liquefaciens*, *Raoultella* (προηγούμενος *Klebsiella*) *planticola*, *Raoultella ornithinolytica* και *Citrobacter freundii* (Kim et al., 2003). Επιπρόσθετα στα εντερικά βακτήρια τα *Clostridium spp.*, *Vibrio alginolyticus*, *Acinetobacter lowffi*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas spp.* και *Photobacterium spp.* έχουν επίσης αναφερθεί σαν παραγωγοί ισταμίνης (Chen et al. 2008).

Η αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης (Histidine decarboxylase – HDC) πραγματοποιείται με την επίδραση του ενζύμου αποκαρβοξυλάση. Ανάλογα με την προέλευση της αποκαρβοξυλάσης, υπάρχουν και διαφορετικοί τύποι του ενζύμου. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια παράγουν ετερόμετρα αποκαρβοξυλάση (Konagaya et al., 2002), ενώ η αποκαρβοξυλάση των ζώων και των Gram-αρνητικών βακτηρίων είναι εξαρτώμενη από την 5-φωσφορική πυριδοξάλη (Kim et al., 2001). Είναι επίσης πιθανό τα προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση να περιέχουν ισταμίνη και από τους δύο τύπους.

Είτε παράγονται από Gram-θετικά ή Gram-αρνητικά βακτηρίδια, οι αποκαρβοξυλάσες μπορεί να είναι παρούσες στα ψάρια και η ισταμίνη μπορεί να παραχθεί ακόμα και όταν τα βακτήρια έχουν νεκρωθεί. Αυτό έχει πλέον επιβεβαιωθεί σε πειράματα με τη χρήση ανασυνδυασμένων HDCs που παράγουν τα βακτήρια *P.phosphoreum*, *Photobacterium damsela*, *R. planticola*, και *M. morganii* (Kanki et al., 2007).

Μολονότι ο σχηματισμός ισταμίνης ελέγχεται καλύτερα με την αποτροπή κατάχρησης χρόνου-θερμοκρασίας, είναι τώρα γνωστό ότι υπάρχουν βακτήρια με την ικανότητα να σχηματίζουν αυξημένες συγκεντρώσεις ισταμίνης σε θερμοκρασίες τόσο χαμηλές όσο 0-5 °C. Έτσι τα μεσόφιλα βακτήρια όπως τα *Clostridium perfringens*, *Morganella morganii* (Εικόνα 5), *Hafnia alvei* και *Raoultella planticola* δεν είναι, όπως πιστευόταν παλαιότερα, τα μόνα που παρήγαγαν ισταμίνη. Το βακτήριο *Morganella psychrotolerans*, που έχει μεγάλη ισχύ στην παραγωγή ισταμίνης, προσδιορίστηκε ως ένα ψυχροανθεκτικό βακτήριο (Emborg et al., 2006).



**Εικόνα 5:** Βακτήρια (*Clostridium perfringens* – αριστερά και *Morganella morganii* – δεξιά) που συμμετέχουν στην αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης

Η απουσία αλλαγών στα επίπεδα ισταμίνης σε ορισμένες μελέτες όπου τα ψάρια φυλάχθηκαν σε χαμηλή θερμοκρασία θα μπορούσε να εξηγηθεί από την παρουσία βακτηρίων που αποσυνθέτουν ισταμίνη με δυνατότητα να υδρολύουν την ισταμίνη σε χαμηλές θερμοκρασίας. Πολλά ψυχοτροπικά είδη όπως η *Pseudomonas* έχουν την ικανότητα να αποσυνθέτουν ισταμίνη σε χαμηλή θερμοκρασία. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες αποθήκευσης (30 °C) δεν βρέθηκε μείωση της ποσότητας ισταμίνης. Η παρατήρηση αυτή εξηγείται από την κυριαρχία των ισταμινο-παραγωγικών βακτηρίων (Guizani et al., 2005).

### **1.3.3 Συνέπειες της ισταμίνης στην υγεία**

Τοξικολογικές μελέτες για την επίδραση της ισταμίνης στον άνθρωπο από διάφορα τρόφιμα, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ισταμίνη έχει χαμηλή τοξικότητα σε δόση των 8-40 mg, μέτρια στα 440 mg και σοβαρή στα 4100 mg (Lehane and Olley, 2000). Λόγω της άνισης κατανομής της ισταμίνης στο σώμα του ψαριού, τα 50 mg/kg έχουν καθοριστεί από την U. S Food and Drug Administration (USFDA) ως

όριο ασφαλείας (2001). Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, στον κανονισμό αριθ. 2073/2005 της 15 Νοεμβρίου 2005 (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2005) σχετικά με τα μικροβιολογικά κριτήρια για τα τρόφιμα, η συγκέντρωση ισταμίνης σε αλιευτικά προϊόντα από είδη ιχθύων που σχετίζονται με υψηλή ποσότητα ισταμίνης θεωρείται ικανοποιητική εάν μεταξύ των εννέα δειγμάτων που ελέγχθηκαν, η μέση παρατηρηθείσα συγκέντρωση είναι 100 mg/kg, ένα μέγιστο των δύο δειγμάτων έχουν μια συγκέντρωση μεταξύ 100 και 200 mg/kg και καμία συγκέντρωση δεν υπερβαίνει το όριο των 200 mg/kg.

Παρά το γεγονός ότι η αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) έχει θέσει τα 5 mg/100 g ψαριών ως το μέγιστο επιτρεπόμενο επίπεδο, ισταμίνη σε 67 και 180 mg έχει δοθεί από του στόματος σε εθελοντές χωρίς κανένα σημάδι τοξικότητας (Bulushi, 2009). Ο βαθμός της τοξικότητας της ισταμίνης φαίνεται να εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα του συστήματος αποτοξίνωσης του σώματος.

Δεν έχει διαπιστωθεί άμεση σχέση μεταξύ της ανάπτυξης ισταμίνης και την υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Διαπιστώθηκε ότι τόνος που αποθηκεύτηκε σε 0-20 ° C απορρίφθηκε οργανοληπτικά πριν η ισταμίνη φτάσει το επιτρεπόμενο επίπεδο των 5 mg/100g ψαριού. Από την άλλη πλευρά, διαπιστώθηκε ότι η σαρδέλα που αποθηκεύεται στις ίδιες θερμοκρασίες είχε καταστεί ανασφαλής για κατανάλωση λόγω των υψηλών επιπέδων ισταμίνης πριν από την απόρριψη από τα αισθητήρια όργανα. Σε άλλες μελέτες δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ του σχηματισμού ισταμίνης και την οργανοληπτική αξιολόγηση κατά την αποθήκευση ψαριών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ωστόσο, ανέφεραν ότι ο τόνος που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος χάλασε και έγινε μη ασφαλής για κατανάλωση μέσα σε μία ημέρα, ενώ αυτός που είναι αποθηκευμένος σε 0 ° C χάλασε μετά από 12 ημέρες. Σε αυτή τη μελέτη η ισταμίνη δεν υπερβαίνει τα 5 mg/100 g κατά τη διάρκεια 17 ημερών αποθήκευσης σε πάγο (Guizani et al. 2005).

Η έλλειψη σχέσης μεταξύ του επιπέδου ισταμίνης και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων, εξηγεί την υψηλή συχνότητα δηλητηρίασης από ισταμίνη (Lehane and Olley, 2000).

Τρεις είναι οι κύριοι παράγοντες που οδηγούν σε τροφοδηλητηρίαση από ισταμίνη από ψάρια:

α) Η κατανάλωση ψαριών πλούσιων σε ιστιδίνη, τα οποία είναι συνήθως ψάρια με σκούρα σάρκα

β) τα αρνητικά Gram εντερικά βακτηρίδια που αποικίζουν πρέπει να περιέχουν την αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης, το ένζυμο που είναι απαραίτητο για τη μετατροπή της ιστιδίνης σε ισταμίνη

γ) σε κάποιο σημείο μετά την αλίευση, τα ψάρια πρέπει να έχουν εκτεθεί σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες για να επιτραπεί ο βακτηριακός πολλαπλασιασμός και ο μεταβολισμός της ιστιδίνης

Εκτιμώντας ότι τα φρέσκα ψάρια έχουν επίπεδα ισταμίνης στους ιστούς τους λιγότερα από 1 mg/100 g, τα 20 mg/100 g πιστεύεται ότι είναι το επίπεδο που απαιτείται για να προκαλέσει ασθένεια (Hungerford, 2010).

Ο χρόνος της εμφάνισης των συμπτωμάτων της δηλητηρίασης από ισταμίνη κυμαίνεται από μερικά λεπτά έως 3 ώρες μετά από την κατανάλωση ψαριών που περιέχουν ισταμίνη σε επίπεδα υψηλότερα από 100 mg/100 g. Τα πιο συνηθισμένα συμπτώματα της δηλητηρίασης αυτής είναι ζάλη, λιποθυμία, κνησμός, αίσθημα καύσου στο στόμα, και η ανικανότητα κατάποσης. Τα θύματα συνήθως συνέρχονται εντός 8 h (Bulushi et al, 2009). Ξεκινά με αίσθημα καύσου στη γλώσσα, που μπορεί να συγχέεται και με «πικάντικη» ή μεταλλική γεύση των ψαριών. Προοδευτικά εμφανίζεται έξαψη στο πρόσωπο, στο λαιμό, στον κορμό και ένας χαρακτηριστικός πονοκέφαλος. Ναυτία, ταχυκαρδία και κοιλιακός πόνος είναι επίσης συχνά χαρακτηριστικά. Πιο σοβαρά συμπτώματα, όπως η αναπνευστική δυσχέρεια και η δυσλειτουργία του μυοκαρδίου, είναι εξαιρετικά σπάνια και περιορίζονται σε μεμονωμένα περιστατικά (Wilson et al, 2012).

Η διάγνωση βασίζεται στα χαρακτηριστικά του συνδρόμου που εμφανίζονται σύντομα μετά την κατανάλωση ψαριού. Εργαστηριακές δοκιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να υποστηρίξουν τη διάγνωση. Αυξημένα επίπεδα ισταμίνης στο πλάσμα, εντός 4 ωρών από την κατανάλωση, έχουν προταθεί ως δείκτης της ασθένειας. (Bedry et al., 2000)

Υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ της ευαισθησίας σε δηλητηρίαση από ισταμίνη ανάμεσα στα άτομα. Ένας τρόπος αναγνώρισης εάν πρόκειται για δηλητηρίαση από ισταμίνη ή αλλεργική αντίδραση είναι το ποσοστό των ατόμων που θα νοσήσουν μετά την κατανάλωση του γεύματος. Στην περίπτωση παρουσίας ισταμίνης στο ψάρι, το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων που το κατανάλωσαν θα εμφανίσει συμπτώματα, ενώ αντίθετα ελάχιστα άτομα θα παρουσιάσουν συμπτώματα εάν πρόκειται για μια απλή αλλεργία. Η θεραπεία της δηλητηρίασης από ισταμίνη περιλαμβάνει τη χορήγηση αντιισταμινικών (Hungerford, 2010).

#### **1.3.4. Επιδημιολογικά δεδομένα**

Η προτεραιότητα που δίνεται στην τροφική δηλητηρίαση από ισταμίνη εντός της ΕΕ και μέσω του ολοκληρωμένου προγράμματος SEAFOODplus και των δραστηριοτήτων στο πλαίσιο το έργου BIOCOM (βιογενείς αμίνες σε θαλασσινά – αξιολόγηση και διαχείριση της έκθεσης των καταναλωτών), έχει δώσει δεδομένα παρακολούθησης για 16.000 περιπτώσεις δηλητηρίασης από ισταμίνη σε διάφορες χώρες από τα μέσα της δεκαετίας του 1960 μέχρι και το 2000. (Sumner and Ross, 2002)

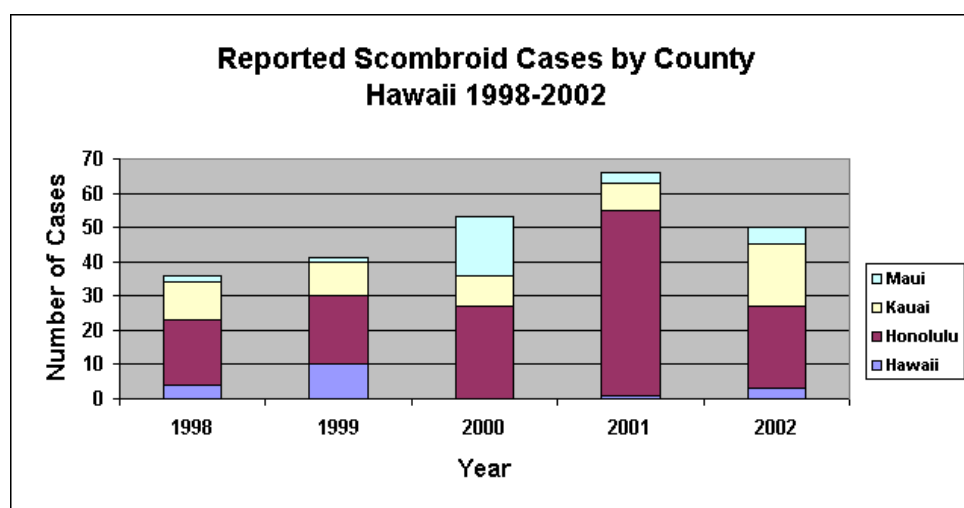
Η δηλητηρίαση από ισταμίνη βρίσκεται ανάμεσα στις πιο συχνές χημικές δηλητηριάσεις από θαλασσινά και θεωρείται η πιο διαδεδομένη από τις ασθένειες που σχετίζονται με ψάρια (Hungerford, 2010). Στις ΗΠΑ, η δηλητηρίαση από ισταμίνη αντιπροσωπεύει το 38% του συνόλου των κρουσμάτων που σχετίζονται με θαλασσινά και στην Αγγλία και την Ουαλία το 32% στη δεκαετία του 1990.



Κρούσματα εξακολουθούν να αναφέρονται ανά τον κόσμο, συμπεριλαμβανόμενης μιας μεγάλης έξαρσης κρουσμάτων (71 άτομα) το 2011 στη Σενεγάλη (Demoncheaux et al., 2012).

Έρευνες ανα τον κόσμο δίνουν μεγάλη ποικιλία στα ποσοστά ισταμίνης ανάλογα με το δείγμα και την επεξεργασία του ψαριού. Στη Γερμανία τα υψηλότερα επίπεδα ισταμίνης έχουν μετρηθεί σε τηγανητό ψάρι. Στην Ταϊβάν, έπειτα από ξέσπασμα δηλητηριάσεων, βρέθηκαν σε ξιφία συγκεντρώσεις ισταμίνης από 859 ως 2.937 χιλιοστογραμμάρια ανά κιλό. Συνολικά, το ποσοστό των δειγμάτων ψαριών στην Ταϊβάν που ξεπερνούν το όριο αγγίζει το 6,5%. Στη Ρωσία σε επιστημονική μελέτη αναφέρεται ότι μόλις το 4,7% από τα 149 δείγματα φρέσκου και κονσερβοποιημένου ψαριού που ελέχθησαν περιείχε ισταμίνη πάνω από το επιτρεπτό όριο. Στην Πολωνία η ισταμίνη σε φρέσκο και επεξεργασμένο ψάρι κυμαινόταν από μηδέν ως 160 χιλιοστογραμμάρια ανά κιλό. Στην Τουρκία το 7,7% των δειγμάτων περιείχε την τοξίνη σε συγκεντρώσεις πάνω από 1.000 χιλιοστογραμμάρια ανά κιλό. Στη Νέα Ζηλανδία το ποσοστό των δειγμάτων στα οποία ανιχνεύθηκε η τοξίνη δεν ξεπερνά το 7,5%. (Vosikis, 2009)

Για τις χώρες με τα υψηλότερα ποσοστά επιδημιών οι αριθμοί κυμαίνονταν σε 2 με 5 εξάρσεις κρουσμάτων / έτος / εκατομμύριο ανθρώπων (παραδείγματα είναι η Δανία, η Νέα Ζηλανδία, η Γαλλία και η Φινλανδία). Οι ΗΠΑ εμφανίζουν χαμηλά ποσοστά σε εξάρσεις κρουσμάτων σκρομβοειδούς δηλητηρίασης, με εξαίρεση τη Χαβάη, (Εικόνα 6) όπου αναφέρθηκε ένας πολύ υψηλότερος ρυθμός της τάξεως του 31/ έτος /εκατομμύριο ανθρώπων αναφέρθηκε (CSPI, 2005). Επίσης, έχει υποστηριχθεί ότι δεν είναι δυνατόν να μειωθεί η εμφάνιση των δηλητηριάσεων από ισταμίνη, είτε στην Ευρώπη, είτε στις ΗΠΑ μιας και είναι δύσκολο να ελεγχθεί και να μειωθεί η κατανάλωση ψαριών που έχουν αλιευθεί από ερασιτέχνες ψαράδες (Dalgaard et al., 2008).



Εικόνα 6: Διάγραμμα περιπτώσεων ασθενών στη Χαβάη

Η ερασιτεχνική αλιεία διαδραματίζει πιθανά σημαντικό ρόλο στον μεγάλο αριθμό των κρουσμάτων που αναφέρθηκαν στη Χαβάη, όμως δεν εξηγούνται περαιτέρω οι

επιδημίες εκείνες που συνδέονται με εμπορικά αλιεύματα, εστιατόρια, κλπ. Επισημαίνεται επίσης ότι στις ανεπτυγμένες χώρες, όπως οι ΗΠΑ και η Ιαπωνία τα περισσότερα κρούσματα δηλητηρίασης από ισταμίνη είναι αποτέλεσμα της κατανάλωσης ψαριών που αλιεύονται ερασιτεχνικά, εξαιτίας της μη επαρκούς ψύξης στα σκάφη αναψυχής. Το 1991 η Εθνική Ακαδημία Επιστημών (NAS, 1991) σε έκθεσή της ανέφερε ότι περισσότερο από το 20% όλων των ψαριών που πωλούνται στις Ηνωμένες Πολιτείες έχουν αλιευθεί από ερασιτέχνες ψαράδες και υποστηρίχθηκε ότι η πώληση των αλιευμάτων που αλιεύθηκαν ερασιτεχνικά, θέτει σε μεγαλύτερο κίνδυνο για δηλητηρίαση από ισταμίνη, ενώ η εμπορική βιομηχανία ψαριών ήταν υπεύθυνη για λιγότερες περιπτώσεις δηλητηριάσεων (Hungerford, 2010).

Στις ελληνικές σαρδέλες τα επίπεδα ισταμίνης βρέθηκαν χαμηλά (3 - 22 χιλιοστογραμμάρια ανά κιλό). Αντίστοιχες μετρήσεις στη Βραζιλία έδειξαν συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 1,2 ως 36 χιλιοστογραμμάρια ανά κιλό. Στην Ιαπωνία η ισταμίνη σε σαρδέλες βρέθηκε από 50 ως και 3.400 χιλιοστογραμμάρια ανά κιλό(tonima, 2008) .

Παρά το γεγονός ότι είναι μια σχετικά ήπια δηλητηρίαση, λόγω της συχνής εμφάνισης της συμβάλλει αρνητικά στην εικόνα του καταναλωτή για τα θαλασσινά. Με αυτό τρόπο, η δηλητηρίαση από ισταμίνη αποτελεί πρόβλημα λόγω των οικονομικών ζημιών και επειδή εξουδετερώνει τα πιθανά οφέλη για την υγεία από την αυξημένη κατανάλωση θαλασσινών (Emborg, 2008).

### **1.3.5 Νομοθεσία**

Λόγω των τοξικολογικών επιπτώσεων των βιογενών αμινών στην υγεία του ανθρώπου, έχουν προταθεί και καθοριστεί κανονισμοί και νομικά πλαίσια για τα ανώτατα όρια βιογενών αμινών σε υδρόβια προϊόντα από πολλές χώρες και διεθνείς οργανισμούς(Kim et al., 2011). Για παράδειγμα, 50 mg/kg HIM έχει προταθεί από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ως ενδεικτικό επίπεδο στα ψάρια (FDA, 1996). Η FDA συνέστησε επίσης ότι 100 mg/kg TYM και 1000 mg/kg συνολικών βιογενών αμινών πρέπει να είναι το επίπεδο ανοχής στα ψάρια (FDA των ΗΠΑ, 2001). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), το αποδεκτό επίπεδο HIM στα ψάρια Scombridae προτείνεται να είναι λιγότερο από 100 mg/kg, και το μέγιστο επίπεδο συνολικών βιογενών αμινών θα πρέπει να είναι μικρότερο από 300 mg/kg στα ψάρια και στα προϊόντα τους(EK, 2005).

Από το 2006 ο έλεγχος των τροφίμων για την παρουσία ισταμίνης διεξάγεται από την Α΄ Χημική Υπηρεσία Πειραιά και από τη Β΄ Χημική Υπηρεσία Θεσσαλονίκης, σύμφωνα με τον Κανονισμό 2073/2005. (gs1, 2007)

### **1.3.6 Επιτήρηση επιπέδων ισταμίνης**

Το RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) αποτελεί ακόμα ένα εργαλείο για την επιτήρηση των επιπέδων ισταμίνης στα ψάρια. Η νομική βάση του RASFF είναι ο

κανονισμός Νο 178/2002 (European Communities, 2002). Λειτουργεί από το 1979 ως εργαλείο για την γρήγορη ενημέρωση ανάμεσα στα κράτη-μέλη για απειλές σχετικές με την ασφάλεια τροφίμων. Το RASFF ως εργαλείο διαχείρισης κινδύνου παρέχει ενδιαφέροντα στοιχεία για την εκτίμηση κινδύνου. Το RASFF περιλαμβάνει καθημερινές ενημερώσεις για γεγονότα σχετικά με την ασφάλεια τροφίμων τόσο στο εσωτερικό της Ευρωπαϊκής ένωσης όσο και στο εξωτερικό. Η βάση δεδομένων του μπορεί να ερευνηθεί με χρήση μηχανής αναζήτησης και περιλαμβάνει δεδομένα όπως: «έλεγχος ορίων/απόρριψη», «έλεγχοι εταιριών», «καταγγελίες καταναλωτών» και «επίσημοι έλεγχοι». (Leuschner et al., 2012)

Η βάση δεδομένων του βρίσκεται στο Κέντρο Διοίκησης Επικοινωνίας και Πηγών Ενημέρωσης (CIRCA – Communication and Information Resource Centre Administrator) της Επιτροπής και αποτελείται από μια βάση δεδομένων της Acess. Περιλαμβάνει λεπτομερείς πληροφορίες σε κάθε αναφορά, όπως είδος και ημερομηνία αναφοράς, την αιτία της (π.χ. περιγραφή του κινδύνου και του προϊόντος), την απειλή που προσδιορίστηκε, τη φύση του προϊόντος, την χώρα αναφοράς, τη χώρα προέλευσης του προϊόντος, την εργαστηριακή ανάλυση που πραγματοποιήθηκε κλπ. Οι αναφορές που καταχωρούνται στη βάση δεδομένων εξαρτώνται από τα εθνικά προγράμματα επιτήρησης και την αποτελεσματικότητα των εργαστηρίων κάθε χώρας. (EFSA, 2010)

Οι αναφορές του RASFF περιλαμβάνουν και βιολογικούς κινδύνους και μολυσματικούς παράγοντες όπως κάποιες βιογενείς αμίνες. Αυτοί είναι η ισταμίνη, η τρυπταμίνη, τα βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ισταμίνης και οι εξάρσεις τροφιμογενών νοσημάτων (RASFF, 2009)

Κατά το 2009, αναλύθηκαν 355 δείγματα ψαριών κυρίως κατά την εισαγωγή τους. Δεκαοκτώ από αυτά βρέθηκαν εκτός του επιτρεπόμενου νομοθετικού ορίου, [Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 2073/2003] αφορούσαν δείγματα εισαγωγής και αποτράπηκε η διανομή τους στην αγορά. Κατά το 2012, αναλύθηκαν 336 δείγματα ψαριών (εγκυτιωμένα, καπνιστά και κατεψυγμένα) κυρίως κατά την εισαγωγή τους. Δε βρέθηκαν μη ικανοποιητικά δείγματα γεγονός που υποδεικνύει την αποτελεσματικότητα του ελέγχου. (moh, 2012)

Κατά το 2013 στην Ελλάδα βρέθηκαν δείγματα τόνου σε κονσέρβα, με επίπεδα ισταμίνης ανάμεσα στα 100 και τα 200 mg/kg, που είχαν εισαχθεί από την Ταϊλάνδη. Αντίστοιχα δείγματα εισαγωγής από την Ταϊλάνδη με επίπεδα ισταμίνης εκτός ορίων ανιχνεύθηκαν τόσο το 2011 όσο και το 2010. Το 2009 παρατηρήθηκαν περιπτώσεις σαρδέλας εισαγωγής από Ταϊλάνδη και Μαρόκο που τα επίπεδα ισταμίνης ήταν άνω του επιτρεπτού ορίου. Ακόμα το 2008 και το 2007 εισήχθει στην Ελλάδα κονσερβοποιημένος τόνος από το Βιετνάμ με ισταμίνη σε ποσότητες 300 – 500 mg/kg. (RASFF, 2013)

Από δείγματα που συλλέχθηκαν από το 2002 ως το 2007 από το πανεπιστήμιο Ιωαννίνων και αναλύθηκαν με HPLC και ELISA τα αποτελέσματα είχαν ως εξής: οκτώ από τα 55 δείγματα (14,5%) που αναλύθηκαν με HPLC, υπερέβησαν το όριο για την αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (US FDA) (50 mg/kg), ενώ 16 από τα 106 δείγματα (15%) που αναλύθηκαν με ELISA υπερέβησαν το ίδιο όριο. Μόνο ένα 3,2% των δειγμάτων που αναλύθηκαν με HPLC θεωρήθηκε ακατάλληλο

για κατανάλωση σύμφωνα με τα όρια της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Στα δείγματα αντζούγιας που αναλύθηκαν κανένα δεν ξεπερνούσε τα όρια παρουσίας ισταμίνης σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση (Vosikis, 2009).

#### **1.4. Αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού ισταμίνης**

Οι μέθοδοι για τον προσδιορισμό των βιογενών αμινών στα τρόφιμα είναι πολυάριθμες. Οι πρώτες διαδικασίες που αναπτύχθηκαν επικεντρώθηκαν στις πιο σημαντικές τοξικολογικά αμίνες - ισταμίνη και τυραμίνη. Για τον προσδιορισμό των αμινών έχουν προταθεί χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC - thin layer chromatography), χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (IEC - ion exchange chromatography), αέρια χρωματογραφία (GC - gas chromatography) και υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC - high performance liquid chromatography). Καλά αποτελέσματα παρέχονται επίσης με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζώνης (CZE - capillary zone electrophoresis) (Akbari-Adergani et al., 2010).

Η ταχύτερη μέθοδος για την ανίχνευση της ισταμίνης βασίζεται στην ανάλυση εγχύσεως ροής (FIA - Fluorescent Indicator Adsorption) και είναι ικανή για διαλογή 60 εκχυλισμάτων ανά ώρα. Οι ανησυχίες σχετικά με τον έλεγχο των συνθηκών της αντίδρασης και του ρυθμού ροής έχουν ήδη αντιμετωπιστεί με τη χρήση εμπορικών κιτ. (Hungerford et al., 2001) Μία τροποποιημένη έκδοση της διαδικασίας αυτής είναι ικανή να προσφέρει υψηλή ταχύτητα και ταυτόχρονη διαλογή τόσο για ισταμίνη όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής αναστολής της οξειδάσης της διαμίνης σε εκχυλίσματα ψαριού, με το συνδιασμό της με ένα ακινητοποιημένο αντιδραστήριο οξειδάσης της διαμίνης (Hungerford and Arefyev, 1992).

Επειδή οι αμίνες είναι ισχυρές οργανικές βάσεις μπορούμε να επωφεληθούμε από αυτό το χαρακτηριστικό τους για το διαχωρισμό τους από το δείγμα. Για το σκοπό αυτό το υπερχλωρικό οξύ χρησιμοποιείται ευρέως ως μέσο εκχύλισης. Στις υγρές χρωματογραφικές τεχνικές οι αμίνες διαχωρίζονται ως παράγωγα. Το 5-διμεθυλαμινο-1-ναφθαλινοσουλφονικό χλωρίδιο έχει την πιο ευρεία χρήση ως αντιδραστήριο για την παραγοντοποίηση αμινών. Ως εκ τούτου, η μέθοδος TLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά π.χ. στη βιομηχανία τροφίμων (Shakila et al., 2001). Μία ευρεία ποικιλία οργανικών διαλυτών μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Στις σύγχρονες μεθόδους προτιμούν μη τοξικούς. Τα όρια ανίχνευσης είναι 5-10 ng κατά την εφαρμογή του φθορισμού πυκνότητας (Lappa-Guimaraes and Pickova, 2004).

Ακόμα εκχυλίσματα υπερχλωρικού οξέος εγχύονται χωρίς περαιτέρω επεξεργασία πάνω σε στήλη ανταλλαγής κατιόντων και εκλύονται με μεθανοσουλφονικό διάλυμα οξέος. Τα όρια ανίχνευσης (7-12 mg / kg) είναι υψηλότερα σε σύγκριση με άλλες τεχνικές χρωματογραφίας. Η δυνατότητα χρησιμοποίησης ενός αναλυτή αμινοξέων είναι ένα μεγάλο πλεονέκτημα της IEC (Favaro et al., 2007).. Η χρωματογραφία αερίου δεν είναι τόσο συχνά εφαρμοζόμενη για τον προσδιορισμό των αμινών. Βιογενείς αμίνες σε δείγματα ψαριών παραγοντοποιούνται με πενταφθοροπροπιονικό ανυδρίτη (Du et al, 2002).

Επιπλέον, αρωματικές και ετεροκυκλικές βιογενείς αμίνες μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν με ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς ζώνης (CZE) χωρίς παραγωγοποίηση λόγω της εγγενούς τους απορρόφησης υπεριώδους φωτός. Η ισταμίνη στα ψάρια προσδιορίζεται με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 2.5 (Rossano et al., 2006). Η HPLC περιλαμβάνει προ-ή μετα-στήλης παραγοντοποίηση. Οι βιογενείς αμίνες μπορούν να διαχωριστούν ως ζεύγη ιόντων ή με αντίστροφης φάσης HPLC. Η οκτανοσουλφονική νατρίου έχει συχνά χρησιμοποιηθεί ως παράγων ζευγαρώματος ιόντων. Οι αμίνες παραγοντοποιούνται με οφθαλδεύδη. (Santos et al., 2003)

Από το 2004 μια νέα γενιά στατικής φάσης που αντέχει πολύ υψηλές πιέσεις (έως 1000 bar), καθώς και συμβατά συστήματα υγρής χρωματογραφίας έχουν εμπορευματοποιηθεί από διάφορους προμηθευτές με την εμπορική ονομασία Ultra Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία (UPLC). (Nguyen et al., 2007) Η UPLC, χρησιμοποιώντας μικρά σωματίδια (<2 μm) σε κοντές στήλες (5 cm) μπορεί να μειώσει δραστικά το χρόνο ανάλυσης χωρίς απώλεια στην απόδοση. Συγκρίνοντας με τη συμβατική HPLC μέθοδο, η UPLC έδειξε πολλά πλεονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένων του μειωμένου χρόνου και της λιγότερης κατανάλωσης διαλυτών (Liu et al., 2007).

Επίσης, διάφορα εμπορικά κιτ ενζυμο-συνδεδεμένου προσδιορισμού (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA) είναι διαθέσιμα για ανίχνευση ισταμίνης σε τρόφιμα. Η ELISA είναι μία αξιόπιστη και εύκολη στο χειρισμό μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ανάλυση ισταμίνης και χρησιμοποιείται συνήθως ως μέθοδος διαλογής (Kose et al., 2009).

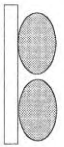
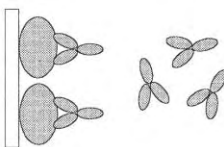
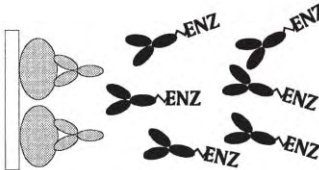
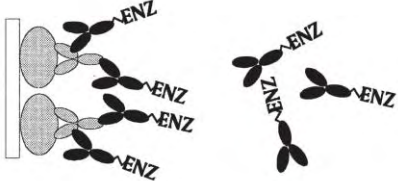
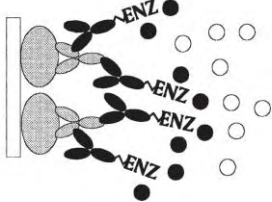
### **1.4.1 ELISA**

Η ELISA εξελίχθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1960 από τη RIA (Radioimmunoassay) με την παρατήρηση ότι είτε το αντίσωμα είτε ο αναλύτης (αντιγόνο) θα μπορούσε να προσροφηθεί σε μια στερεή επιφάνεια και να εξακολουθεί να συμμετέχει σε συγκεκριμένες υψηλής συγγένειας δεσμεύσεις. Η διαδικασία προσρόφησης διευκόλυνε το διαχωρισμό του δεσμευμένου και ελεύθερου αναλύτη, κάτι που είχε αποδειχθεί δύσκολο να επιτευχθεί για πολλούς αναλύτες με RIA. Το κοινό χαρακτηριστικό όλων αυτών των δοκιμασιών παραμένει η χρησιμοποίηση αντισωμάτων για την ανίχνευση ενός αναλύτη. (piercenet, 2008)

Οι ενζυμο-συνδεδεμένες ανοσοαπορροφητικές δοκιμασίες (ELISA) είναι αναλύσεις που έχουν σχεδιαστεί για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ουσιών όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες, αντισώματα και ορμόνες. Άλλα ονόματα, όπως ανοσοδοκιμασία ενζύμου (EIA), χρησιμοποιούνται επίσης για να περιγράψουν την ίδια τεχνολογία. Σε μια ELISA, ένα αντιγόνο θα πρέπει να ακινητοποιηθεί σε μία στερεή επιφάνεια και στη συνέχεια συμπλέκεται με ένα αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο. Η ανίχνευση επιτυγχάνεται με την εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας του συζευγμένου ενζύμου μέσω της επώασης με ένα υπόστρωμα για να παραχθεί ένα μετρήσιμο προϊόν. Το πιο σημαντικό στοιχείο της στρατηγικής της ανίχνευσης είναι η πολύ ειδική αλληλεπίδραση αντισώματος-αντιγόνου. (Εικόνα 7)

Τα κυριότερα είδη ELISA είναι:

- η άμεση ELISA
- η έμμεση ELISA
- η ELISA- «σάντουιτς» ( Crowther, 2009)

Περιγραφή διαδικασίας ELISA	Σχηματική απεικόνιση
Αντιγόνα είναι προσροφημένα παθητικά στη σταθερή επιφάνεια της κυψελίδας.	
Αντισώματα προστίθενται και επώάζονται. Τα ειδικά θα συνδεθούν με τα αντιγόνα. Τα υπόλοιπα αποπλένονται μετά τη φάση επώασης.	
Αντισώματα επισημασμένα με ένζυμα (συζευγμένα) στρέφονται κατά των αντισωμάτων που έχουν συνδεθεί με τα αντιγόνα στην σταθερή επιφάνεια.	
Αυτά τα συζευγμένα αντισώματα συνδέονται με οποιαδήποτε αντισώματα είναι συνδεδεμένα με αντιγόνο. Η περίσσεια συζευγμάτων αποπλένεται μετά από μια περίοδο επώασης.	
Υπόστρωμα χρωμοφόρο προστίθεται και αναπτύσσεται χρώμα, ως αποτέλεσμα της παρουσίας του ενζύμου. Μετά από μια περίοδο επώασης το αναπτυσσόμενο χρώμα διακόπτεται και μετριέται σε φασματοφωτόμετρο η ένταση του.	

Εικόνα 7: Περιγραφή της διαδικασίας της ELISA σε κάθε φάση

Σε κάθε περίπτωση εμπορικής συσκευασίας, η τεχνική ELISA αποτελεί ένα ετερογενές σύστημα, που περιλαμβάνει τρεις βασικές παραμέτρους:

- Πλαστική πλάκα μικροτιτλοδότησης (solid-phase microtiter) με μια διαμόρφωση 8x12 κυψελίδων (wells), μέσα στις οποίες προσκολλάται ένα αντιδραστήριο
- Διαχωρισμό ελεύθερων από δεσμευμένα αντιδραστήρια, με προσθήκη και προσκόλληση παθητικά στη σταθερή φάσης ουσία των κυψελίδων και απομάκρυνση των ελεύθερων με ένα πλύσιμο
- Αποτελέσματα, τα οποία αποκτώνται με ανάπτυξη χρώματος (Crowther, 2009)

Ενδεικτικά, οι διαθέσιμες εμπορικές συσκευασίες ELISA για τον προσδιορισμό ισταμίνης καθώς και τα χαρακτηριστικά επίδοσης τους παρουσιάζονται στον πίνακα 5

**Πίνακας 5:** Εμπορικές συσκευασίες ELISA

Όνομασία kit	Εταιρία	Είδος ανάλυσης	Ευαισθησία	Χρόνος διαδικασίας
Veratox	Neogen	Ποσοτική ανάλυση	2 ppm - 50 ppm	35 minutes
Ridascreen	R-Biopharm	Ποσοτική ανάλυση	> 2.5 ppm	90 minutes
Ridaquick	R-Biopharm	Ποσοτική ανάλυση	> 20 ppm	12 minutes
Histameter	Biomedix	Ποσοτική ανάλυση	0 ppm - 50 ppm	60 minutes
HistaQuant	Biomedix	Ποιοτική ανάλυση	0 ppm - 500 ppm	60 - 90 minutes
Histamarine	Beckman-Coulter	Ποσοτική ανάλυση	1 ppm - 500 ppm	30 minutes
Transia tube Histamine	Raisio Diagnostics	Ημι-ποσοτική ανάλυση	25 ppm - 200 ppm	60 minutes
Histasure	LDN	Ημι-ποσοτική ανάλυση	50 ppm	10 minutes
MaxSignal	Bioscientific	Ποσοτική ανάλυση	> 4 ppm	15 minutes
Reveal histamine screening	Neogen	Ποιοτική ανάλυση	50 ppm	5 minutes
The Food EIA	LDN	Ποσοτική ανάλυση		60 minutes

## **2. Μεθοδολογία**

### **2.1 Δειγματοληψία**

Για την εκπόνηση της μελέτης συλλέχθηκαν 50 συνολικά δείγματα ψαριών από ιχθυαγορές και μεγάλα εμπορικά καταστήματα τροφίμων από τους 4 νομούς της Θεσσαλίας. Τα δείγματα συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν υπό συνθήκες ψύξης στο Εργαστήριο Επιδημιολογίας και Υγιεινής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας όπου και πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της ισταμίνης.

### **2.2 Προσδιορισμός ισταμίνης**

#### **2.2.1. Επιλογή εμπορικής συσκευασίας ELISA**

Με βάση τα χαρακτηριστικά επίδοσης των διαθέσιμων εμπορικών συσκευασιών ELISA για τον προσδιορισμό της ισταμίνης σε αλιεύματα επιλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε το κιτ ενζυμικής ανοσοδοκιμασίας για προσδιορισμό ισταμίνης RIDASCREEN. Το RIDASCREEN® ισταμίνης (Art. No: R1601, 96 πηγάδια / Art. No: R1604, 48 πηγάδια) είναι μια ανταγωνιστική ενζυμική ανοσοδοκιμασία για την ποσοτική ανάλυση της ισταμίνης στα τρόφιμα.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες τα δυο από τα διαθέσιμα κιτ (Veratox και Ridascreeen) ήταν αυτά που στατιστικά παρουσίαζαν τη μεγαλύτερη συμφωνία τόσο μεταξύ τους όσο και με τα αποτελέσματα των ίδιων δειγμάτων με τη μέθοδο HPLC (Kose et al., 2011)

#### **2.2.2. Υλικά και όργανα**

- Πλάκα ακυλίωσης: πλάκα ακυλίωσης (χωρίς επικάλυψη) με 96 υποδοχές/πηγαδάκια για ακυλίωση
- Σωλήνες ακυλίωσης: 96 x (R1601) ή 48 x (R1604) σωλήνες ακυλίωσης (πλαστικό) για ακυλίωση
- Standards 1-6: 6 πρότυπα ισταμίνης (4 ml το καθένα) 0 ppb, 0,5 ppb, 1,5 ppb, 5 ppb, 15 ppb, 50 ppb
- Κοντρόλ 1 (4 ml), συγκέντρωση βλέπε φιαλίδιο
- Κοντρόλ 2 (4 ml), συγκέντρωση βλέπε φιαλίδιο
- Αντιδραστήριο ακυλίωσης: 2 χ (R1601) ή 1 χ (R1604) αντιδραστηρίου ακυλίωσης (1,5 ml), έτοιμο για χρήση
- Ρυθμιστικό διάλυμα ακυλίωσης (22 ml), έτοιμο για χρήση



- Μικροπλάκα με 96 ή 48 πηγαδάκια (12 ταινίες, R1601 ή 6 ταινίες, R1604 με 8 πηγαδάκια το καθένα) επικαλυμμένα με ισταμίνη
- Σύζευγμα (12 ml, R1601 ή 6 ml, R1604)
- Αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση, έτοιμο για χρήση
- Αντίσωμα αντι-ισταμίνης (12 ml, R1601 ή 6 ml, R1604) έτοιμο προς χρήση
- Υπόστρωμα-/χρωμογόνο (12 ml, R1601 ή 6 ml, R1604) περιέχει τετραμεθυλο-βενζιδίνη, έτοιμο για χρήση
- Διάλυμα διακοπής (12 ml), περιέχει 0,5 N θεικού οξέος, έτοιμο προς χρήση
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσεως (20 ml), σε συμπύκνωση 50X
- Φασματοφωτόμετρο μικροπλάκας (450 nm) PR 2100
- Φυγόκεντρος (Eppendorf centrifuge 5810R) και πλαστικά φιαλίδια φυγοκέντρωσης
- Vortex (press to-mix 34524 snijders)
- Μικροπιπέτες που κυμαίνονται μεταξύ 20 μl - 200 μl και 200 - 1000 μl (pipet 4u)
- Απεσταγμένο νερό

### **2.2.3 Αναλυτική Τεχνική**

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Επιδημιολογίας και Υγιεινής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η ανάλυση περιελάμβανε 2 φάσεις: προετοιμασία δειγμάτων και κυρίως ανάλυση με ELISA

#### **Προετοιμασία δειγμάτων**

Τα δείγματα διατηρήθηκαν υπό ψύξη μέχρι την εκτέλεση του πειράματος. Στη περίπτωση των φρέσκων ψαριών ένα κομμάτι βάρους 100 gr περίπου αφαιρέθηκε από περιοχές του ψαριού με μεγαλύτερη ποσότητα μυός. Στα είδη σε κονσέρβα αφού αφαιρέθηκε το υγρό της κονσέρβας, συλλέχτηκε δείγμα 100 gr. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς περιέκτες των 10 ml. Από κάθε δείγμα 10 gr ομογενοποιήθηκαν σε τριβλίο Petri με χρήση γλωσσοπίεστρου. Σε δοκιμαστικό σωλήνα Α που περιέχει 9 ml απεσταγμένο H<sub>2</sub>O προστέθηκε 1 gr από το ομογενοποίημα. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 5λεπτά στις 2500 g σε θερμοκρασία δωματίου και ύστερα το λίπος απομακρύνθηκε με πουαρ. Σε έναν δεύτερο σωλήνα Β που περιείχε 9 ml H<sub>2</sub>O προστέθηκε 1 ml από το υπερκείμενο του προηγούμενου σωλήνα. Μετά από ανάδευση 200 μl του μίγματος προστέθηκαν σε ένα σωλήνα Γ ο οποίος περιείχε 9,8 ml H<sub>2</sub>O.

#### **Προετοιμασία αντιδραστηρίων**

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν σε θερμοκρασία δωματίου. Το ρυθμιστικό διάλυμα παρέχεται 50 φορές συμπυκνωμένο. Πριν τη χρήση αραιώθηκε 1:50 με απεσταγμένο H<sub>2</sub>O, δηλαδή σε 490 ml H<sub>2</sub>O προστέθηκαν 10 ml συμπυκνωμένου ρυθμιστικού.

#### **Διαδικασία ακυλίωσης**

Στην πλάκα ακυλίωσης προστέθηκαν 100 μl κάθε δείγματος καθώς και 100 μl από το κάθε πρότυπο δείγμα και το κάθε δείγμα - μάρτυρα. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 25 μl αντιδραστηρίου ακυλίωσης και 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος. Μετά από κυκλική ανάδευση για λίγα sec η πλάκα επώαστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

### Διαδικασία ELISA

Στην πλάκα της ELISA προστέθηκαν 25 μl από κάθε ακυλιωμένο δείγμα, κάθε πρότυπο δείγμα και κάθε δείγμα μάρτυρα. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 100 μl αντισώματος αντι-ισταμίνης και ακολούθησε ανάδευση. Στην συνέχεια η πλάκα επώαστηκε για 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υγρό από τα πηγαδάκια απομακρύνθηκε με την προσθήκη 250 μl διαλύματος πλύσης και άδειασμα του υγρού. Η διαδικασία έκπλυσης επαναλήφθηκε 3 φορές. Έπειτα σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 100 μl συζευτικού διαλύματος και μετά από ανάδευση μερικόν sec ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Ακολούθησε απομάκρυνση του υγρού από τα πηγαδάκια με την προσθήκη 250 μl διαλύματος πλύσης και άδειασμα του υγρού ( διαδικασία που επαναλήφθηκε 3 φορές). Τέλος προστέθηκαν 100 μl χρωμογόνου υποστρώματος και, μετά από ανάδευση, η πλάκα καλύφθηκε με σελοφάν και επώαστηκε στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, για 15 λεπτά. Μετά από προσθήκη διαλύματος διακοπής και κυκλική ανάδευση για λίγα sec ακολούθησε φωτομέτρηση στα 450 nm. Από τα αποτελέσματα τις φωτομέτρησης κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη και ποσοτικοποιήθηκε η ισταμίνη στα δείγματα. Η όλη διαδικασία παρουσιάζεται συνοπτικά στον Πίνακα 7.

**Πίνακας 6:** Περιγραφή πειραματικής διαδικασίας

	<b><u>RIDASCREEN<sup>®</sup></u></b> <b><u>ισταμίνης</u></b>
	<b>6 standards, 2 control</b>
<b>ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</b>	Ομογενοποίηση 10 g δειγματος
	9 ml απεσταγμένου H <sub>2</sub> O σε 1 g ομογενοποίησηματος
	φυγοκέντρηση: 2500g/5'/20-25° C
	απομακρυνση λίπους
	1 ml υπερκείμενου + 9 ml H <sub>2</sub> O
	αραίωση: 200 μl από το παραπάνω διάλυμα + 9,8 ml απεσταγμένου H <sub>2</sub> O
	αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου

<b>ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ</b>	ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης: αραίωση 1:50. 10 ml συμπυκνωμένου ρυθμιστικού σε 490 ml απεσταγμένου H <sub>2</sub> O
	αντιδραστήριο ακυλίωσης (παρέχεται έτοιμο προς χρήση)
<b>ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΚΥΛΙΩΣΗΣ</b>	<b>6 standards, 2 control</b>
<b>ΣΤΡΩΣΙΜΟ ΠΛΑΚΑΣ</b>	100 μl δείγματος
	25 μl αντιδραστηρίου ακυλίωσης
	200 μl ρυθμιστικού διαλύματος ακυλίωσης
	κυκλική κίνηση για λίγα secs
<b>ΕΠΩΑΣΗ</b>	15' σε θερμοκρασία δωματίου
<b>ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ELISA</b>	<b>6 standards, 2 control</b>
<b>ΣΤΡΩΣΙΜΟ ΠΛΑΚΑΣ</b>	25 μl ακυλιωμένου δείγματος
	100 μl διαλύματος αντισώματος αντι-ισταμίνης
	κυκλική κίνηση για λίγα secs
<b>ΕΠΩΑΣΗ 1η</b>	40' σε θερμοκρασία δωματίου
<b>ΠΛΥΣΙΜΟ</b>	απομάκρυνση υγρού από τα πηγαδάκια
	προσθήκη 250 μl διαλύματος πλύσης και άδειασμα του υγρού (3 φορές)
<b>ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΣΥΖΕΥΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ</b>	100μl διαλύματος σύζευξης (conjugate)
	κυκλική κίνηση για λίγα secs
<b>ΕΠΩΑΣΗ 2η</b>	20' σε θερμοκρασία δωματίου
<b>ΠΛΥΣΙΜΟ</b>	απομάκρυνση υγρού από τα πηγαδάκια
	προσθήκη 250 μl διαλύματος πλύσης και άδειασμα του υγρού (3 φορές)
<b>ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΧΡΩΜΟΓΟΝΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ</b>	100 μl διαλύματος χρωμογόνου υποστρώματος
	κυκλική κίνηση για λίγα secs
<b>ΕΠΩΑΣΗ 3η</b>	κάλυψη πλάκας
	15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι
<b>ΔΙΑΚΟΠΗ</b>	100μl διαλύματος διακοπής (stop)

	κυκλική κίνηση για λίγα secs
<b>ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ</b>	στα 450nm

### 2.3. Στατιστική Επεξεργασία

Τα αναλυτικά αποτελέσματα συσχετίστηκαν στατιστικά με τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Η συγκέντρωση ισταμίνης (ποσοτική μεταβλητή) παρουσιάστηκε ως μέση τιμή με την τιμή απόκλισης ή/και ως διάμεσος με το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (25ο -75ο ποσοστημόριο), και την ελάχιστη και τη μέγιστη τιμή. Οι ποιοτικές μεταβλητές παρουσιάστηκαν ως συχότητες με τα αντίστοιχα ποσοστά. Το μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney test ή το Kruskal-Wallis test χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθούν οι σχέσεις μεταξύ ποιοτικών μεταβλητών και συγκέντρωσης ισταμίνης. Ένα αποτέλεσμα θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό όταν το p-value ήταν μικρότερο του 0.05 (p-value < 0.05)

### 2.4. Χρήση RASFF

Εκτός από τα δείγματα που χρησιμοποιήσαμε πειραματικά, χρησιμοποιήσαμε πληροφορίες από το RASFF (rapid alert system for food and feed) portal για τις περιπτώσεις και τις ποσότητες ισταμίνης σε ψάρια που έχουν εντοπιστεί σε χώρες της Ευρώπης τα τελευταία 2 χρόνια. Συγκεκριμένα η έρευνα στο RASFF έγινε χρησιμοποιώντας τον όρο «ψάρι και αλιευτικά προϊόντα» στην κατηγορία προϊόντος και τον όρο «ισταμίνη» στην κατηγορία “notification subject”. Τέλος η έρευνα μας έγινε για τα χρονικά διαστήματα 2011-2013. Παράδειγμα έρευνας στο RASFF portal παρουσιάζεται στην Εικόνα 8.

## **RASFF Portal**

### **Notifications list**

**Search criteria** | Subject \*HISTAMINE\* | Product category fish and fish products

Classification	Date of case	Last change	Reference	Country	Type	Product Category / Subject
1. information for attention	23/07/2013	23/07/2013	2013.1022	Italy	food	fish and fish products histamine (1397; 3810 mg/kg - ppm) in chilled vacuum packed yellow fin tuna (Thunnus albacares) from Spain
2. information for attention	30/01/2013	23/07/2013	2013.0101	Italy	food	fish and fish products histamine (2934.4; 600 mg/kg - ppm) in chilled tuna from Spain
3. information for attention	31/05/2013	15/07/2013	2013.0764	Italy	food	fish and fish products histamine (1323 mg/kg - ppm) in chilled sardines from Italy
4. information for attention	25/06/2013	09/07/2013	2013.0891	Italy	food	fish and fish products histamine (779.25 mg/kg - ppm) in canned salted sardines (Sardina pilchardus) from Tunisia
5. alert	03/06/2013	05/07/2013	2013.0769	Italy	food	fish and fish products histamine (1524 mg/kg - ppm) in canned tuna in olive oil from Spain
6. information for attention	03/07/2013	03/07/2013	2013.0936	Italy	food	fish and fish products histamine (530 mg/kg - ppm) in sardines from Tunisia
7. alert	23/05/2013	27/06/2013	2013.0714	Switzerland	food	fish and fish products histamine (290; 4200 mg/kg - ppm) in anchovies in olive oil from Spain
8. alert	06/06/2013	19/06/2013	2013.0793	Italy	food	fish and fish products histamine (between 108 and 1526 mg/kg - ppm) in chilled smoked tuna from Spain
9. information for attention	08/03/2013	18/06/2013	2013.0328	Greece	food	fish and fish products histamine (4 out of 9 samples between 100 and 200 mg/kg - ppm) in canned tuna flakes in oil from Thailand

Εικόνα 8: Παράδειγμα έρευνας στο RASFF portal

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1. Περιγραφή δείγματος

Συνολικά από 21/01/2013 έως 01/04/2013 συλλέχθηκαν 50 δείγματα από τους 4 νομούς της Θεσσαλίας. Τα δείγματα μας αποτελούνταν από δείγματα που συλλέχθηκαν από supermarket σε ποσοστό 90% και από ψαραγορά σε ποσοστό 10%. Ακόμα το 44% των δειγμάτων συλλέχθηκαν από το νομό Λάρισας, το 16% από το νομό Τρικάλων, το 24% από τη Καρδίτσα και το υπόλοιπο 16% από το νομό Μαγνησίας. Τέλος τα δείγματα ανήκανε σε 7 διαφορετικά είδη ψαριών που είχαν υποστεί διαφορετική επεξεργασία σε ποσοστά που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 7: Περιγραφή δειγμάτων

		<u>Συχνότητα</u>	<u>Ποσοστό (%)</u>
<u>Προέλευση</u>	Supermarket	45	90
	Ψαραγορά	5	10
	<b>Σύνολο</b>	<b>50</b>	<b>100</b>
<u>Νομός</u>	Λάρισα	22	44
	Τρίκαλα	8	16
	Καρδίτσα	12	24
	Μαγνησία	8	16
	<b>Σύνολο</b>	<b>50</b>	<b>100</b>
<u>Είδος</u>	Αντζούγια	4	8
	Γαύρος	8	16
	Ρέγγα	5	10
	Σαρδέλα	13	26
	Σκουμπρί	5	10
	Σολωμός	7	14
	Τόνος	8	16
	<b>Σύνολο</b>	<b>50</b>	<b>100</b>
<u>Μεταποίηση</u>	Φρέσκο	10	20
	Κονσέρβα	28	56
	Καπνιστό	8	16
	Κατεψυγμένο	4	8
	<b>Σύνολο</b>	<b>50</b>	<b>100</b>

Συγκεκριμένα, 10 ήταν φρέσκα ψάρια των ειδών: σολωμός, σαρδέλα, γαύρος, αντζούγια και τα υπόλοιπα 40 επεξεργασμένα ψάρια όπως καπνιστή ρέγγα, καπνιστός σολωμός, γαύρος, σολωμός, τόνος, σαρδέλα και αντζούγια σε κονσέρβα, καπνιστό σκουμπρί, κατεψυγμένο σολομό, ρέγγα, σαρδέλα και γαύρο. Αναλυτικά, τα στοιχεία των δειγμάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Η ταυτότητα των δειγμάτων που

αναλύθηκαν, είναι απόρρητη και χρησιμοποιήθηκε μόνο από την ομάδα που τα μελέτησε.

**Πίνακας 8:** Δείγματα ψαριών

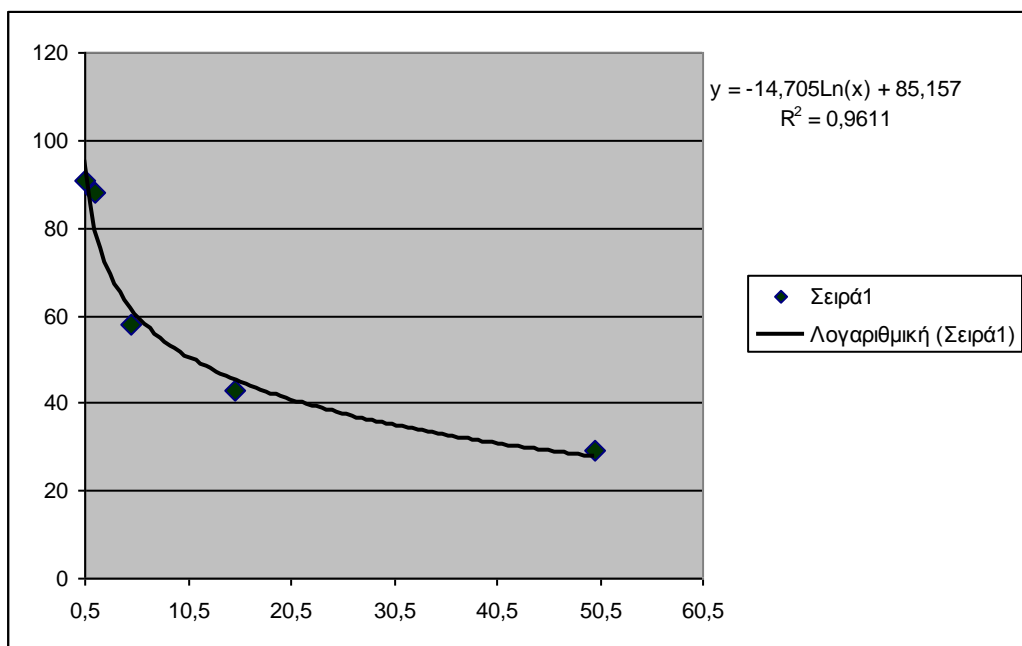
α/α	Δείγμα	Επεξεργασία	Περιοχή	Ημερ. Παραλαβής	Ημερ. λήξης	Κωδ. Παρτίδας
1	Αντζούγια	Κονσέρβα (φιλέτο σε ηλιέλαιο)	Λάρισα	-	2/10/2013	L0932
2	Γαύρος	Κονσέρβα (ριγανάτος σε λαδι)	Λάρισα	-	31/12/2017	1205224233
3	Ρέγγα	Καπνιστή (φιλέτο)	Λάρισα	-	1/9/2013	5205326001068
4	Τόνος	Κονσέρβα (κομμάτια)	Λάρισα	-	8/4/2015	TH1025
5	Σκουμπρί	Καπνιστό	Λάρισα	-	27/3/2013	5205326001129
6	Σαρδέλα	Κονσέρβα (σε λάδι)	Λάρισα	-	31/12/2015	1010275110
7	Σκουμπρί	Κονσέρβα (φιλέτο σε λάδι)	Λάρισα	-	30/6/2013	1004302233
8	Ρέγγα	Καπνιστή (φιλέτο)	Λάρισα	-	30/6/2017	1202211290
9	Σολομός	Κονσέρβα (σε ηλιέλαιο)	Λάρισα	-	28/2/2013	72D5JNTCTHKWT09
10	Σολομός	Φρέσκος	Λάρισα	29/1/2013	-	-
11	Σαρδέλα	Φρέσκια	Λάρισα	29/1/2013	-	-
12	Γαύρος	Φρέσκος	Λάρισα	29/1/2013	-	-
13	Ρέγγα	Καπνιστή	Βόλος	-	17/3/2013	262651
14	Αντζούγια	Φρέσκια (ακέφαλη)	Βόλος	6/2/2013	-	-
15	Σαρδέλα	Κονσέρβα (σε λάδι)	Βόλος	-	31/1/2018	-
16	Γαύρος	Κονσέρβα	Βόλος	-	31/12/2017	LG1205242317
17	Τόνος	Κονσέρβα (σε ηλιέλαιο)	Βόλος	-	1/8/17	MIKFON8NCD
18	Σολομός	Φρέσκος	Βόλος	6/2/2013	-	-
19	Σαρδέλα	Φρέσκια	Βόλος	6/2/2013	-	-
20	Γαύρος	Φρέσκος	Βόλος	6/2/2013	-	-
21	Σαρδέλα	Κονσέρβα (πικάντικη σε λάδι)	Τρίκαλα	-	30/6/2017	-
22	Σκουμπρί	Καπνιστό (φιλέτο σε λάδι)	Τρίκαλα	-	30/6/2017	LT1206205201
23	Τόνος	Κονσέρβα (σε ηλιέλαιο)	Τρίκαλα	20/8/2017		M23320336
24	Ρέγγα	Καπνιστή	Τρίκαλα	-	23/12/2013	-
25	Αντζούγια	Κονσέρβα (φιλέτο σε λάδι)	Τρίκαλα	-	-	00000007544610
26	Σκουμπρί	Καπνιστό (φιλέτο ριγανάτο σε λάδι)	Τρίκαλα	-	-	00000007544520
27	Σαρδέλα	Φρέσκια	Τρίκαλα	7/2/2013	-	-
28	Γαύρος	Φρέσκος	Τρίκαλα	7/2/2013	-	-
29	Σαρδέλα	Κονσέρβα (πικάντικη σε ηλιέλαιο)	Καρδίτσα	-	1/12/2016	L352M
30	Σκουμπρί	Κονσέρβα (φιλέτο σε σάλτσα ντομάτας)	Καρδίτσα	-	31/12/2017	LT120715122
31	Σολομός	Κονσέρβα (φιλέτο σε νερό)	Καρδίτσα	-	31/12/2016	L154124
32	Τόνος	Κονσέρβα (σε νερό)	Καρδίτσα	-	1/11/2015	MI2HFWNBXCD
33	Γαύρος	Κονσέρβα (ριγανάτος σε λαδι)	Καρδίτσα	-	31/12/2017	LT1205182109
34	Αντζούγια	Κονσέρβα (σε λάδι)	Καρδίτσα	-	1/11/2013	MA332FFRBMAROC
35	Σαρδέλα	Κατεψυγμένη	Καρδίτσα	-	4/10/2014	NO1238
36	Σολομός	Καπνιστός	Καρδίτσα	-	8/3/2013	N0000067228
37	Ρέγγα	Κονσέρβα (φιλέτο)	Καρδίτσα	-	18/2/2013	13411501
38	Γαύρος	Κατεψυγμένος	Καρδίτσα	-	18/1/2012	-
39	Σολομός	Κατεψυγμένος	Καρδίτσα	-	1/6/2013	73433W/11320T
40	Σολομός	Φρέσκος	Καρδίτσα	13/2/2013	-	-

41	Σαρδέλα	Κονσέρβα (φιλέτο με λεμόνι και βασιλικό)	Λάρισα	-	1/12/2015	35312/10:19/005
42	Γαύρος	Κονσέρβα ( με ρίγανη και σκόρδο)	Λάρισα	-	6/10/2016	3A279
43	Σαρδέλα	Κονσέρβα (σε λάδι)	Λάρισα	-	30/6/2017	-
44	Τόνος	Κονσέρβα (σε νερό)	Λάρισα	-	31/12/2016	E:X-129NLP14:37
45	Τόνος	Κονσέρβα (φιλέτο σε ηλιέλαιο)	Λάρισα	-	1/11/2017	MI2YSONB3CD
46	Τόνος	Κονσέρβα (σε ηλιέλαιο)	Λάρισα	-	1/8/2017	MI2IFON8XCD
47	Τόνος	Κονσέρβα (ολόκληρος σε ηλιέλαιο)	Λάρισα	-	1/6/2015	SEAEOUSSSSCBG69
48	Σαρδέλα	Κονσέρβα (φιλέτο σε λάδι)	Λάρισα	-	1/10/2017	33912/11:24/002
49	Σαρδέλα	Κονσέρβα (σε σάλτσα ντομάτας)	Λάρισα	-	20/12/2017	4A325
50	Σαρδέλα	Κονσέρβα (πικάντικη σε λάδι)	Λάρισα	-	31/12/2016	-

### **3.2. Αναλυτικά Αποτελέσματα**

Η διαδικασία ελέγχου των δειγμάτων για παρουσία ισταμίνης έγινε σε τρεις φάσεις. Στην πρώτη φάση ελέχθησαν 8 δείγματα, στη δεύτερη 24 και στην τρίτη 18. 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 λογαριθμικής εξίσωσης που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη σε κάθε φάση του πειράματος βρίσκουμε το  $\text{Ln}(x)$  για κάθε δείγμα κι από εκεί τη συγκέντρωση ισταμίνης. Στο Παράρτημα της εργασίας παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των προτύπων δειγμάτων για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης καθώς και τα αποτελέσματα οπτικής απορρόφησης για κάθε δείγμα.

Η πρώτη φάση του πειράματος έγινε 28/01/2013 Μετρώντας την οπτική απορρόφηση των προτύπων δειγμάτων δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη. (Διάγραμμα 1) Σύμφωνα με την καμπύλη αυτή προκύπτει η λογαριθμική εξίσωση  $y = -14,705 \text{Ln}(x) + 85,157$  από την οποία βρίσκουμε το  $\text{Ln}(x)$  για κάθε δείγμα μας και απολογαριθμώντας βρίσκουμε τη συγκέντρωση ισταμίνης. (Πίνακας 9)



**Διάγραμμα 1:** Πρότυπη καμπύλη της 1<sup>ης</sup> φάσης τους πειράματος

**Πίνακας 9:** Συγκέντρωση ισταμίνης στα δείγματα ψαριών (φάση 1<sup>η</sup>)

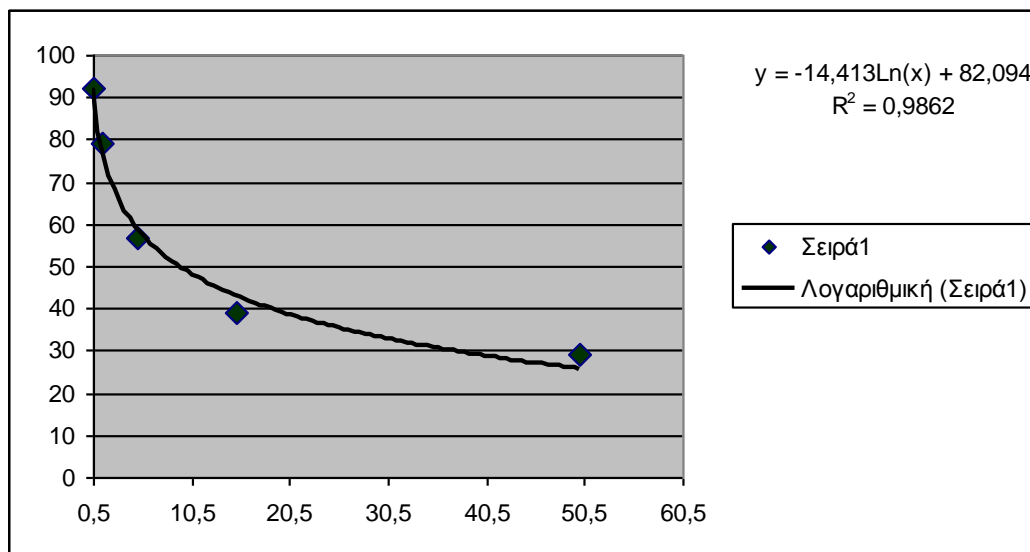
**Δείγματα ψαριών**

<b>Αριθμός δείγματος</b>	<b>Συγκέντρωση ισταμίνης</b>
1	0,21
2	0,35
3	0,58
4	0,03
5	0,04
6	0,18
7	0,14
8	0,30

Η δεύτερη φάση έγινε στις 21/02/2013 και η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με της πρώτης. Η λογαριθμικής εξίσωση που προέκυψε από τη δεύτερη πρότυπη



καμπύλη (Διάγραμμα 2) είναι η  $y = -14,413 \text{ Ln}(x) + 82,094$  από την οποία και προκύπτει η συγκέντρωση ισταμίνης. (Πίνακας 10)



Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη της 2<sup>ης</sup> φάσης τους πειράματος

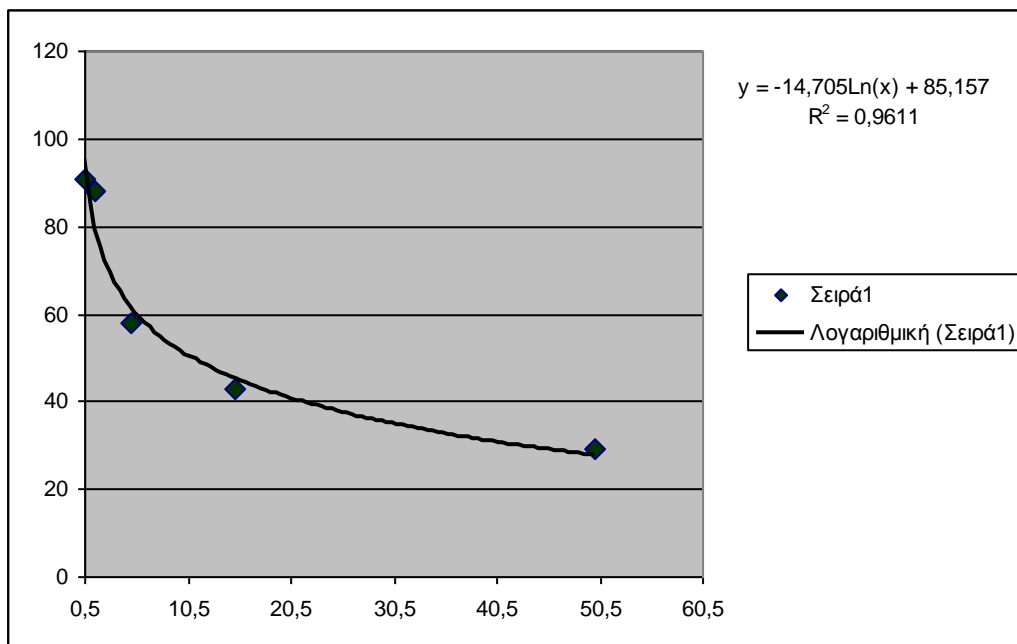
Πίνακας 10: Συγκέντρωση ισταμίνης στα δείγματα ψαριών (φάση 2<sup>η</sup>)

Δείγματα ψαριών

Αριθμός δείγματος	Συγκέντρωση (x)
9	0,52
10	1,37
11	0,67
12	1,50
13	0,33
14	2,76
15	0,94
16	0,77
17	0,72
18	2,05
19	1,10
20	0,36
21	0,75
22	0,04
23	1,85
24	2,21
25	11,91
26	1,28
27	4,38

28	30,23
29	3,06
30	1,94
31	2,22
31	1,05

Αντίστοιχα στη 3<sup>η</sup> φάση του πειράματος που έγινε στις 12/04/2013 η λογαριθμική εξίσωση που προέκυψε από την πρότυπη καμπύλη (Διάγραμμα 3) ήταν η  $y = -14,705 \ln(x) + 85,157$ . Η συγκέντρωση ισταμίνης σε κάθε δείγμα παρουσιάζεται στον Πίνακα 11.



Διάγραμμα 3: Πρότυπη καμπύλη της 3<sup>ης</sup> φάσης του πειράματος

Πίνακας 11: Συγκέντρωση ισταμίνης στα δείγματα ψαριών (φάση 3<sup>η</sup>)

Δείγματα ψαριών

<u>Αριθμός δείγματος</u>	<u>Συγκέντρωση (x)</u>
33	0,51
34	0,99
35	0,84
36	0,39
37	0,43
38	0,33
39	0,22
40	0,60
41	0,10

42	0,07
43	0,09
44	0,08
45	2,55
46	0,07
47	0,42
48	0,16
49	0,50
50	0,34

Με την παρούσα επεξεργασία βρέθηκε η συγκέντρωση ισταμίνης σε κάθε δείγμα Η τελική ποσότητα ισταμίνης σε κάθε δείγμα με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης έχει ως μονάδα μέτρησης ppb. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit το κάθε αποτέλεσμα πολλαπλασιάστηκε με 5000 που είναι ο συντελεστής αραιώσης και ύστερα ακολούθησε μετατροπή σε ppm. Οι τελικές συγκεντρώσεις ισταμίνης που προσδιορίστηκαν για κάθε δείγμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.

**Πίνακας 12:** Τελική συγκέντρωση ισταμίνης ανά δείγμα

<b>Αριθμός δείγματος</b>	<b>Τελική συγκεντρωση ισταμίνης (ppm)</b>
1	1,05
2	1,75
3	2,85
4	0,15
5	0,2
6	0,9
7	0,7
8	1,5
9	2,6
10	6,85
11	3,35
12	7,5
13	1,65
14	13,8
15	4,7
16	3,85
17	3,6
18	10,25
19	5,5
20	1,8
21	3,75
22	0,2
23	9,25
24	11,05
25	59,55
26	6,4

27	21,9
28	151,15
29	15,3
30	9,7
31	11,1
32	5,25
33	2,55
34	4,95
35	4,2
36	1,95
37	2,15
38	1,65
39	1,1
40	3
41	0,5
42	0,35
43	0,45
44	0,4
45	12,75
46	0,35
47	2,1
48	0,8
49	2,5
50	1,7

### **3.3. Συσχέτιση αποτελεσμάτων με τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων**

Τα αποτελέσματα για την παρουσία ισταμίνης σε κάθε δείγμα συγκεντρώθηκαν και ομαδοποιήθηκαν με βάση το είδος του ψαριού, το νομό προέλευσης, το χώρο προέλευσης και την μεταποίηση που το κάθε δείγμα είχε υποστεί όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.

**Πίνακας 13:** Συγκεντρωτικά στοιχεία για την τελική συγκέντρωση ισταμίνης των δειγμάτων

#### **Δείγματα ψαριών**

A/A	Τελική συγκέντρωση ισταμίνης (ppm)	Προέλευση	Νομός	Είδος	Μεταποίηση
1	1,05	1	1	1	2
2	1,75	1	1	2	2
3	2,85	1	1	3	3
4	0,15	1	1	7	2
5	0,2	1	1	5	3
6	0,9	1	1	4	2
7	0,7	1	1	5	2

8	1,5	1	1	3	3
9	2,6	1	1	6	2
10	6,85	2	1	6	1
11	3,35	2	1	4	1
12	7,5	2	1	2	1
13	1,65	1	4	3	3
14	13,8	1	4	1	1
15	4,7	1	4	4	2
16	3,85	1	4	2	2
17	3,6	1	4	7	2
18	10,25	1	4	6	1
19	5,5	1	4	4	1
20	1,8	1	4	2	1
21	3,75	1	2	4	2
22	0,2	1	2	5	3
23	9,25	1	2	7	2
24	11,05	1	2	3	3
25	59,55	1	2	1	2
26	6,4	1	2	5	3
27	21,9	2	2	4	1
28	151,15	2	2	2	1
29	15,3	1	3	4	2
30	9,7	1	3	5	2
31	11,1	1	3	6	2
32	5,25	1	3	7	2
33	2,55	1	3	2	2
34	4,95	1	3	1	2
35	4,2	1	3	4	4
36	1,95	1	3	6	3
37	2,15	1	3	3	4
38	1,65	1	3	2	4
39	1,1	1	3	6	4
40	3	1	3	6	1
41	0,5	1	1	4	2
42	0,35	1	1	2	2
43	0,45	1	1	4	2
44	0,4	1	1	7	2
45	12,75	1	1	7	2
46	0,35	1	1	7	2
47	2,1	1	1	7	2
48	0,8	1	1	4	2
49	2,5	1	1	4	2
50	1,7	1	1	4	2

Όπου «Προέλευση»: 1 = Supermarket  
2 = Ψαραγορά

Όπου «Νομός»: 1 = Λάρισα  
2 = Τρίκαλα  
3 = Καρδίτσα  
4 = Βόλος

Όπου «Είδος»: 1 = Αντζούγια  
2 = Γαύρος  
3 = Ρέγγα  
4 = Σαρδέλα  
5 = Σκουμπρί  
6 = Σολομός  
7 = Τόνος

Όπου «Μεταποίηση»: 1 = Φρέσκο  
2 = Κονσέρβα  
3 = Καπνιστό  
4 = Κατεψυγμένο

Συγκεντρώνοντας όλα τα αποτελέσματα υπολογίσαμε τη μέση τιμή καθώς και την ελάχιστη και μέγιστη τιμή συγκέντρωσης ισταμίνης στα δείγματα μας όπως και τα ποσοστά των δειγμάτων για κάθε έναν από τους 4 διαφορετικούς παράγοντες (προέλευση, νομός, είδος, μεταποίηση).

Ακόμα υπολογίσαμε την τυπική απόκλιση για κάθε δείγμα καθώς και τη διάμεσο, το 25<sup>ο</sup> και το 75<sup>ο</sup> ποσοστημόριο. Βρίσκοντας το p-value για κάθε ομάδα δειγμάτων παρατηρούμε ότι στατιστικά σημαντικά ήταν τα αποτελέσματα μας για το φρέσκο ψάρι (p-value = 0,004) καθώς και τα αποτελέσματα μας από δείγματα που συλλέχθηκαν από σουπερμάρκετ (p-value = 0,015).

**Πίνακας 14:** Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

	Τελική συγκεντρωση ισταμίνης (ppm)							
	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	25ο ποσοστημόριο	75ο ποσοστημόριο	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	p-value
<b>Προέλευση</b>								
Supermarket	5,15	9,23	2,50	1,05	5,25	0,15	59,55	<b>0.015*</b>
Ψαραγορά	38,15	63,57	7,50	6,85	21,90	3,35	151,15	
<b>Είδος</b>								
Αντζούγια	19,84	27,01	9,38	3,00	36,68	1,05	59,55	0.683**
Γάυρος	21,33	52,50	2,18	1,70	5,68	0,35	151,15	
Ρέγγα	3,84	4,06	2,15	1,65	2,85	1,50	11,05	
Σαρδέλα	5,04	6,39	3,35	0,90	4,70	0,45	21,90	
Σκουμπρί	3,44	4,37	0,70	0,20	6,40	0,20	9,70	
Σολωμός	5,26	4,12	3,00	1,95	10,25	1,10	11,10	
Τόνος	4,23	4,63	2,85	0,38	7,25	0,15	12,75	
<b>Μεταποίηση</b>								
Φρέσκο	22,51	45,60	7,18	3,35	13,80	1,80	151,15	<b>0.004*</b>
Επεξεργασμένο	4,94	9,64	2,13	0,85	4,83	0,15	59,55	

\* Mann-Whitney test

\*\* Kruskal-Wallis test

### **3.4. Αποτελέσματα βάσης δεδομενων RASFF**

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του RASFF portal για τη χρονική περίοδο 2011-2013 ποσότητα ισταμίνης σε ψάρια σε επίπεδα που θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν επικίνδυνα βρέθηκε σε 83 περιπτώσεις σε χώρες της Ευρώπης. Στον πίνακα 15 παρουσιάζονται οι ποσότητες ισταμίνης σε δείγματα ψαριών το 2013 ανά ευρωπαϊκή χώρα, ανάλογα με το είδος και την επεξεργασία που έχει υποστεί το δείγμα. Τα αντίστοιχα στοιχεία για το 2012 παρουσιάζονται στον πίνακα 16 και για το 2011 στον πίνακα 17. Για κάθε χρονιά παρουσιάζονται και τα ποσοστά περιπτώσεων παρουσίας ισταμίνης σε διαγράμματα μορφής πίτας (Διάγραμμα 4, 5, 6)

**Πίνακας 15:** Αποτελέσματα παρουσίας ισταμίνης σε δείγματα ψαριών για το 2013 στην Ευρώπη

Έτος	Χώρα	Είδος	Επεξεργασία	Ποσότητα ισταμίνης (ppm)
2013	Ιταλία	σαρδέλα	φρέσκο	530
2013	Ιταλία	σαρδέλα	κονσέρβα	780
2013	Ιταλία	τόνος	καπνιστό	1526
2013	Ιταλία	τόνος	κονσέρβα	1524
2013	Ιταλία	σαρδέλα	φρέσκια	1323

2013	Ιταλία	τόνος	κατεψυγμένος	216
2013	Ιταλία	τόνος	κατεψυγμένος	1770
2013	Ιταλία	τόνος	καπνιστός	4946
2013	Ιταλία	τόνος	κατεψυγμένος	500
2013	Ιταλία	τόνος	κονσέρβα	2700
2013	Ιταλία	σαρδέλα	κατεψυγμένη	500
2013	Ιταλία	τόνος	κατεψυγμένος	1000
2013	Ιταλία	τόνος	κατεψυγμένος	1730
2013	Ιταλία	τόνος	κατεψυγμένος	2500
2013	Ιταλία	τόνος	φρέσκος	-
2013	Ιταλία	τόνος	κατεψυγμένος	600
2013	Ιταλία	τόνος	φρέσκος	4550
2013	Ελβετία	αντζούγια	κονσέρβα	4200
2013	Γερμανία	τόνος	κονσέρβα	450
2013	Ελλάδα	τόνος	κονσέρβα	200
2013	Κύπρος	σαρδέλα	κονσέρβα	300
2013	Δανία	τόνος	κονσέρβα	340
2013	Γαλλία	τόνος	κατεψυγμένος	4375
2013	Γαλλία	μάρλιν	κατεψυγμένο	560
2013	Πολωνία	τόνος	κονσέρβα	>100
2013	Ισπανία	σαρδέλα	κατεψυγμένες	>200
2013	Ισπανία	σαρδέλα	κατεψυγμένες	>300



**Διάγραμμα 4:** Δείγματα ψαριών με ισταμίνη στην Ευρώπη το 2013



**Πίνακας 16:** Αποτελέσματα παρουσίας ισταμίνης σε δείγματα ψαριών για το 2012 στην Ευρώπη

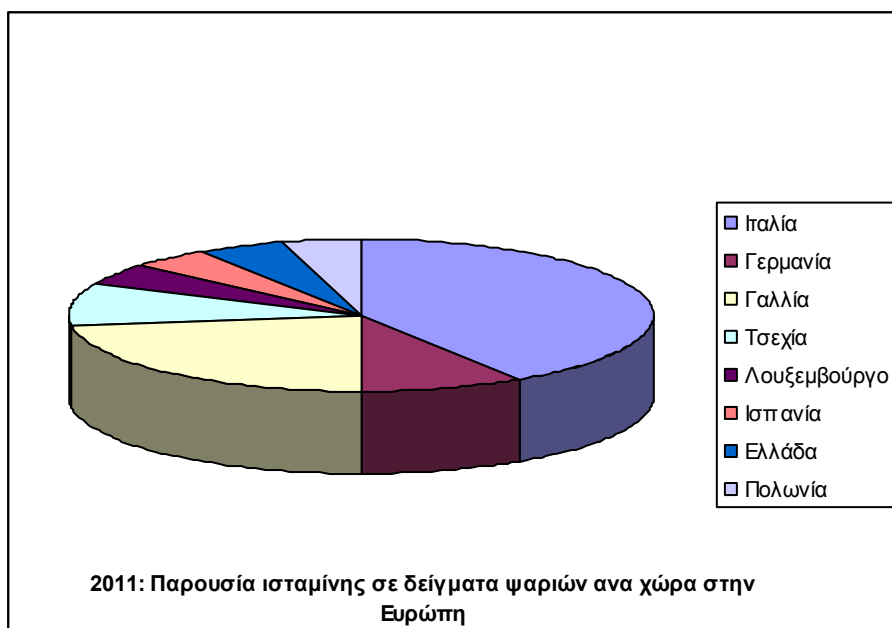
Έτος	Χώρα	Είδος	Επεξεργασία	Ποσότητα ισταμίνης (ppm)
2012	Ιταλία	σαρδέλα	κατεψυγμένες	500
2012	Ιταλία	τόνος	κονσέρβα	430
2012	Ιταλία	τόνος	φρέσκος	900
2012	Ιταλία	τόνος	κατεψυγμένος	1900
2012	Ιταλία	τόνος	κατεψυγμένος	2630
2012	Ιταλία	τόνος	φρέσκος	380
2012	Ιταλία	τόνος	κατεψυγμένος	880
2012	Ιταλία	τόνος	κατεψυγμένος	790
2012	Ιταλία	τόνος	κατεψυγμένος	250
2012	Ιταλία	σαρδέλα	κονσέρβα	600
2012	Ιταλία	τόνος	φρέσκος	500
2012	Ιταλία	σαρδέλα	κονσέρβα	360
2012	Αγγλία	τόνος	κατεψυγμένος	304
2012	Αγγλία	σκουμπρί	κατεψυγμένο	230
2012	Αγγλία	τόνος	κατεψυγμένος	650
2012	Αγγλία	τόνος	κονσέρβα	420
2012	Ιρλανδία	τόνος	φρέσκος	370
2012	Γερμανία	σαρδέλα	φρέσκια	240
2012	Γερμανία	σαρδέλα	κατεψυγμένη	325
2012	Γαλλία	τόνος	κατεψυγμενος	1000
2012	Γαλλία	σαρδέλα	κονσέρβα	240
2012	Γαλλία	σαρδέλα	κονσέρβα	540
2012	Γαλλία	σαρδέλα	φρέσκια	310
2012	Γαλλία	σαρδέλα	φρέσκια	770
2012	Γαλλία	σαρδέλα	κονσέρβα	240
2012	Γαλλία	τόνος	κατεψυγμένος	350
2012	Βέλγιο	τόνος	κατεψυγμένος	5100
2012	Βέλγιο	τόνος	κατεψυγμένος	5300
2012	Δανία	τόνος	κατεψυγμένος	4900
2012	Δανία	τόνος	κονσέρβα	1200
2012	Ελβετία	αντζούγια	κονσέρβα	1500
2012	Μάλτα	αντζούγια	κονσέρβα	500
2012	Σουηδία	τόνος	κατεψυγμένος	280
2012	Νορβηγία	τόνος	κατεψυγμένος	3500
2012	Πολωνία	σαρδέλα	κονσέρβα	150



**Διάγραμμα 5:** Δείγματα ψαριών με ισταμίνη στην Ευρώπη το 2012

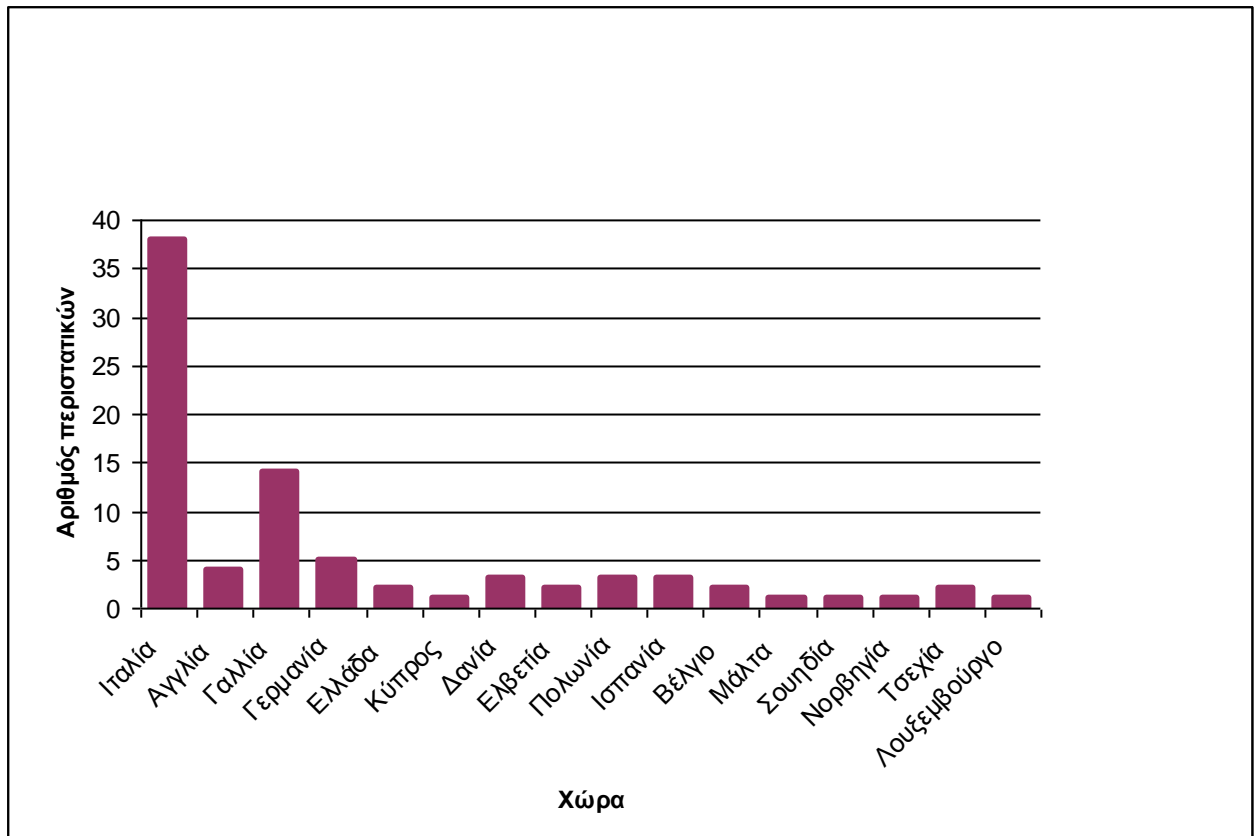
**Πίνακας 17:** Αποτελέσματα παρουσίας ισταμίνης σε δείγματα ψαριών για το 2011 στην Ευρώπη

Έτος	Χώρα	Είδος	Επεξεργασία	Ποσότητα ισταμίνης (ppm)
2011	Ιταλία	τόνος	κατεψυγμένος	3800
2011	Ιταλία	σαρδέλα	κατεψυγμένη	745
2011	Ιταλία	τόνος	κατεψυγμένος	3100
2011	Ιταλία	σκουμπρί	φρέσκο	664
2011	Ιταλία	τόνος	κονσέρβα	313
2011	Ιταλία	τόνος	κατεψυγμένος	1099
2011	Ιταλία	τόνος	κατεψυγμένος	546
2011	Ιταλία	τόνος	κατεψυγμένος	480
2011	Ιταλία	τόνος	φρέσκος	575
2011	Γερμανία	σαρδέλα	κονσέρβα	269
2011	Γερμανία	σαρδέλα	κονσέρβα	316
2011	Γαλλία	σαρδέλα	φρέσκια	258
2011	Γαλλία	σαρδέλα	κονσέρβα	550
2011	Γαλλία	σαρδέλα	κονσέρβα	350
2011	Γαλλία	τόνος	κατεψυγμένος	225
2011	Γαλλία	σαρδέλα	κονσέρβα	1016
2011	Τσεχία	σαρδέλα	κονσέρβα	531
2011	Τσεχία	σαρδέλα	κονσέρβα	1522
2011	Λουξεμβούργο	τόνος	κατεψυγμένος	1130
2011	Ισπανία	τόνος	κατεψυγμένος	600
2011	Ελλάδα	σκουμπρί	κονσέρβα	379
2011	Πολωνία	τόνος	κονσέρβα	179



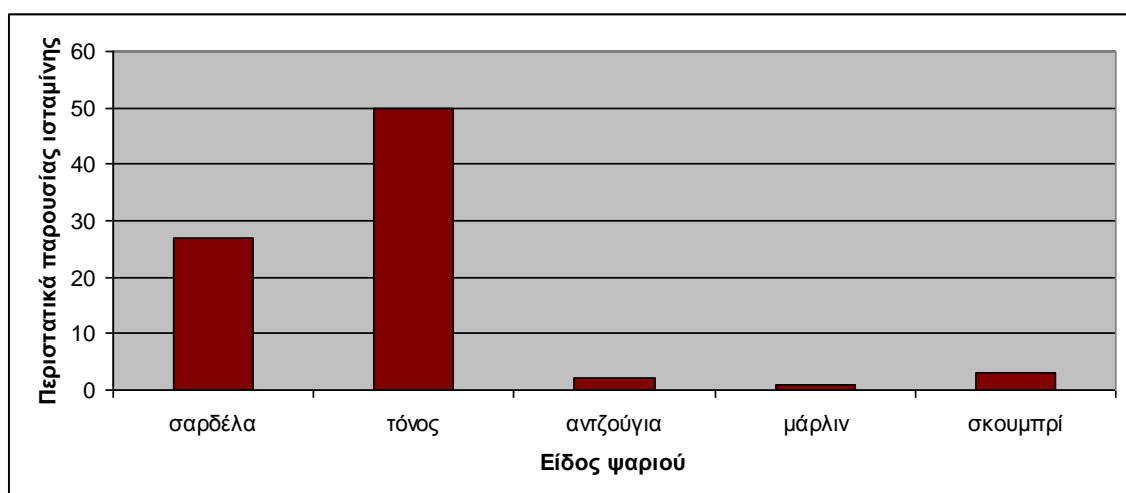
**Διάγραμμα 6:** Δείγματα ψαριών με ισταμίνη στην Ευρώπη το 2011

Παρατηρούμε στο διάγραμμα 7 ότι η Ιταλία είναι η χώρα με τις περισσότερες περιπτώσεις (38 περιστατικά) παρουσίας ισταμίνης σε ψάρια και ακολουθεί η Γαλλία με 14. Στην Τρίτη θέση βρίσκεται η Γερμανία με 5 περιστατικά και έπειτα η Αγγλία με 4. Δανία, Πολωνία και Ισπανία παρουσιάσανε 3 περιστατικά που καταγραφήκανε στο RASFF, ενώ το Βέλγιο, η Τσεχία και η Ελλάδα από 2. Στις τελευταίες θέσεις βρίσκονται η Μάλτα, η Κύπρος, η Σουηδία, η Νορβηγία και το Λουξεμβούργο με ένα καταγεγραμμένο περιστατικό για τη καθεμία. Η Ελλάδα βρίσκεται πολύ χαμηλά στη λίστα αν και αυτό μπορεί να οφείλεται και σε ελλιπείς ελέγχους τόσο σε εισαγόμενα ψάρια όσο και σε φρέσκα.



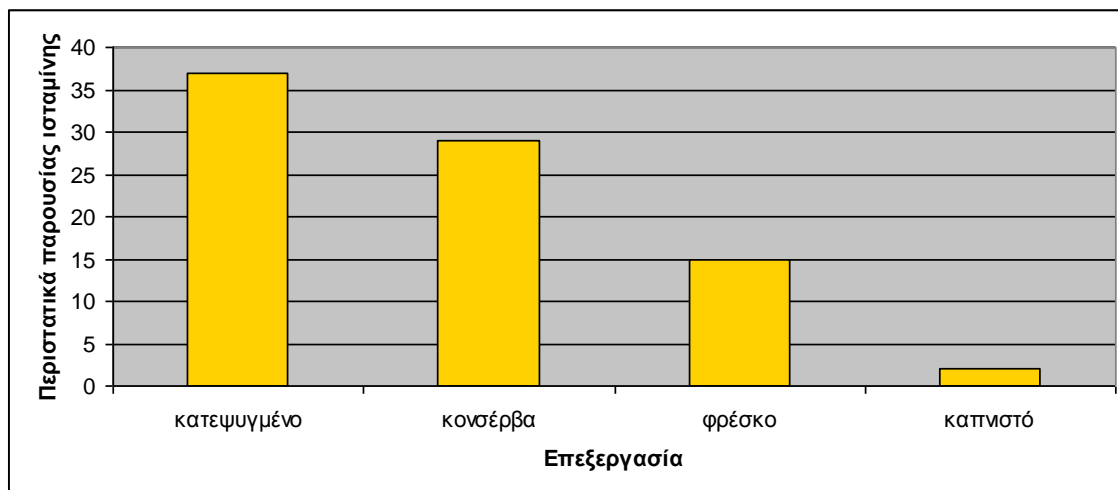
**Διάγραμμα 7:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τη διατροφή 2011-2013 παρουσίας ισταμίνης σε δείγματα ψαριών ανά χώρα

Παρατηρούμε ακόμα σύμφωνα με το διάγραμμα 8 ότι το είδος ψαριού στο οποίο καταγραφήκανε τα περισσότερα περιστατικά παρουσίας ισταμίνης στη διατροφή 2011-2012 είναι ο τόνος και ακολουθεί δεύτερη η σαρδέλα λόγω της μεγάλης ζήτησης και αλίευσης των δύο αυτών ειδών.



**Διάγραμμα 8:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τη διατροφή 2011-2013 παρουσίας ισταμίνης σε δείγματα ψαριών ανά είδος

Τέλος στο διάγραμμα 9 βλέπουμε ακόμα ότι τα περισσότερα περιστατικά παρουσίας ισταμίνης καταγράφηκαν σε περιπτώσεις κατεψυγμένων ψαριών πράγμα που δείχνει τις μη κατάλληλες συνθήκες στις οποίες έγινε η μεταφορά και η συντήρηση των ψαριών αυτών. Ακολουθούν τα ψάρια σε κονσέρβα και έπειτα τα φρέσκα.



**Διάγραμμα 9:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τη διατία 2011-2013 παρουσίας ισταμίνης σε δείγματα ψαριών ανά μορφή μεταποίησης

## 4. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Ανά τον κόσμο οι ποσότητες ισταμίνης σε δείγματα ψαριών διαφόρων ειδών ποικίλουν, με τα υψηλότερα επίπεδα να ανιχνεύονται σε έρευνες μετά από πολλαπλά κρούσματα δηλητηρίασης, ενώ τα χαμηλότερα σε τυχαίες δειγματοληψίες.

Σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στην Τουρκία σε 39 δείγματα κονσερβοποιημένων ψαριών, το 7,7% περιείχε πάνω από 1000 mg/kg. (Erkan et al. 2001) Σε δυο έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στην Ταϊβάν ανιχνεύτηκαν συγκεντρώσεις ισταμίνης ανώτερες από το επιτρεπτό όριο. Συγκεκριμένα, το 6.5% φιλέτων ψαριού από παραδοσιακές αγορές περιείχε ποσότητες ισταμίνης 128-288 mg/kg (Tsai et al. 2004) ενώ το 6% των δειγμάτων από παστό σκουμπρί της δεύτερης έρευνας περιείχε ποσότητες 70-120 mg/kg. (Tsai et al. 2005)

Στο Μεξικό, σε κονσερβοποιημένες σαρδέλες οι ποσότητες ισταμίνης κυμαίνονται από 5 ως 70 mg/kg. (Pacheco-Aguilar et al. 2000). Αντίθετα, στην Ιαπωνία έρευνες μετά από μια έξαρση κρουσμάτων σκομβροειδούς δηλητηρίασης μετά την κατανάλωση σαρδέλας, τα επίπεδα ισταμίνης ήταν 1700 mg/kg. (Kanki et al. 2004) Και σε άλλες έρευνες που γίνανε στην Ιαπωνία σε δείγματα σαρδέλας, παρουσιάστηκαν υψηλά επίπεδα ισταμίνης που φτάνανε τα 3400 mg/kg. (Kan et al. 2005).

Αναλύοντας με ELISA 311 δείγματα στην Ιταλία οι ποσότητες ισταμίνης στο 58% των δειγμάτων ήταν άνω των 2,5 mg/kg ενώ μόνο ένα 5% ξεπέρασε τα ανώτερα όρια της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Τα θετικά δείγματα περιελάμβαναν κυρίως φρέσκες ή επεξεργασμένες αντζούγιες. (Muscarella et al., 2012)

Σε μελέτη, με χρήση ELISA και HPLC, που έγινε από το πανεπιστήμιο Ιωαννίνων σε ένα σύνολο 125 δειγμάτων τα επίπεδα ισταμίνης σε δείγματα που προσδιορίστηκαν με HPLC, κυμαίνονταν από 2,7 mg/kg ως 220 mg/kg. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ισταμίνης με τη χρήση HPLC βρέθηκαν σε δείγματα ρέγγας και αντζούγιες. Οκτώ από τα 55 δείγματα υπερέβησαν το όριο για την αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (US FDA) (50 mg/kg), ενώ 16 από τα 106 δείγματα που αναλύθηκαν με ELISA υπερέβησαν το ίδιο όριο. (Vosikis et al., 2009).

Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης έδειξαν ότι η ποσότητα ισταμίνης κυμάνθηκε από 0,2 μέχρι 151,15 ppm. Ένα 14% των δειγμάτων μας περιείχαν ποσότητες ισταμίνης άνω των 10 ppm, ενώ μόλις δυο δείγματα υπερέβησαν το όριο της Αμερικανικής Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων (>50 ppm) και ένα δείγμα το όριο που έχει θέσει η Ευρωπαϊκή Ένωση (>100 ppm). Πιο συγκεκριμένα, τα θετικά δείγματα ήταν: ένα δείγμα αντζούγιας σε κονσέρβα που περιείχε ποσότητα ισταμίνης ίση με 59,55 ppm και ένα δείγμα φρέσκου γαύρου που περιείχε ποσότητα ισταμίνης 151,15 ppm.

Στην περίπτωση του φρέσκου γαύρου η μεγάλη απόκλιση σε σχέση με τα άλλα δείγματα θα μπορούσε να εξηγηθεί από τις συνθήκες συντήρησης του προϊόντος.

Ο βασικότερος παράγοντες που επηρεάζει την παρουσία ισταμίνης στα ψάρια είναι η θερμοκρασία στην οποία εκτίθεται το δείγμα, όπως έδειξαν μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε φιλέτα τόνου. Τα δείγματα διατηρούνταν σε θερμοκρασία 0-2 °C αλλά εκτίθονταν συστηματικά σε θερμοκρασία 30 °C με αποτέλεσμα να αυξηθεί η ποσότητα ισταμίνης, σε αντίθεση με δείγματα που διατηρούνταν σε υψηλότερη θερμοκρασία (3-4 °C) αλλά η θερμοκρασία έκθεσης τους ήταν 20 °C και στα οποία δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές των επιπέδων ισταμίνης. (Economou, 2007)

Το συγκεκριμένο δείγμα ήταν εκτεθειμένο σε υψηλότερες θερμοκρασίες από ότι τα προϊόντα που έχουν υποστεί επεξεργασία και για το λόγο αυτό η παραγωγή ισταμίνης ήταν αυξημένη. Τα φρέσκα ψάρια που πωλούνται στις ελληνικές ιχθυαγορές δεν υπόκεινται σε επαρκείς ελέγχους, τόσο κατά τη μεταφορά τους όσο και κατά την παραμονή τους την αγορά, πράγμα που αυξάνει τις πιθανότητες αύξησης της ισταμίνης.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μας με εκείνα από το RASFF portal παρατηρούμε ότι η Ελλάδα βρίσκεται όντως χαμηλά στη λίστα με τις περιπτώσεις ψαριών που περιέχουν ισταμίνη σε σχέση με άλλες ευρωπαϊκές χώρες. Βρέθηκε μόνο ένα δείγμα τόνου σε κονσέρβα με συγκέντρωση ισταμίνης 200 ppm το 2013 και άλλο ένα δείγμα κονσέρβα σκουμπρί με συγκέντρωση ισταμίνης 379 ppm το 2011. Τα χαμηλά ποσοστά ισταμίνης σε κονσερβοποιημένα δείγματα οφείλονται στην χρήση HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point Systems) στις ελληνικές βιομηχανίες.

Ως περιορισμός στη μελέτη θα μπορούσε να αναφερθεί ο σχετικά μικρός αριθμός δείγματος που οφείλεται στην έλλειψη φρέσκων δειγμάτων από όλα τα εμπλεκόμενα είδη λόγω εποχής. Ακόμα, τα δείγματα ελέχθησαν με μόνο μια μέθοδο (ανίχνευση μόνο με ELISA) και για το λόγο αυτό δεν μπορούν να παρουσιαστούν συγκριτικά ποσοτικά αποτελέσματα που να επιβεβαιώνουν την αξιοπιστία της μεθόδου

Στο μέλλον θα μπορούσαν να γίνουν μελέτες του ίδιου δείγματος χρησιμοποιώντας δυο ή και παραπάνω διαφορετικές τεχνικές για να ελέγξουμε κατά πόσο τα αποτελέσματα θα ταυτίζονται μεταξύ τους. Ακόμα θα μπορούσε να γίνει δειγματοληψία από βάρκες ερασιτεχνικής αλιείας την ώρα που φτάνουνε στο λιμάνι ή από πλανόδιους ψαράδες που πουλάνε το προϊόν σε λαϊκές αγορές για να ελέγξουμε κατά πόσο οι συνθήκες διατήρησης του σε αυτές τις περιπτώσεις αυξάνουν την ποσότητα ισταμίνης στο δείγμα. Τέλος μια έρευνα σύγκρισης της ποσότητας ισταμίνης σε εγχώρια ψάρια και σε ψάρια εισαγωγής θα μπορούσε να δώσει περαιτέρω στοιχεία για τον κίνδυνο της κατανάλωσης αλιευμάτων.

Συμπερασματικά, από τα 50 δείγματα που αναλύθηκαν με την τεχνική της ELISA μόνο στα 2 ανιχνεύθηκε ποσότητα ισταμίνης που ξεπερνούσε τα όρια κατά την Αμερικάνικη και Ευρωπαϊκή νομοθεσία. Η υψηλή ποσότητα ισταμίνης, εκτός των ορίων για την Ευρωπαϊκή Ένωση, σε δείγμα φρέσκου γαύρου οφείλεται στις κακές συνθήκες συντήρησης του προϊόντος ενώ το δείγμα σαρδέλας σε κονσέρβα ξεπερνάει τα όρια μόνο κατά την Αμερικάνικη νομοθεσία.

## 5. Βιβλιογραφία

### Ξενογλώσση Βιβλιογραφία

1. Akbari-Adergani B, Norouzi P, Ganjali M. R. and Dinarvand R. 2010. Ultrasensitive flow-injection electrochemical method for determination of histamine in tuna fish samples. *Food Research International* 43, 1116–1122
2. Antoine F. R, Wei C. I, Otwell W. S, Sims C. A, Littell R. C. and Hogle A. D. 2002. Analysis of biogenic amines and their precursor free amino acids in mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). *Journal of Food Biochemistry*. 26, 131–152
3. Bedry R, Gabinski C, Paty M. C. 2000. Diagnosis of scombroid poisoning by measurement of plasma histamine. *N Engl J Med*. 342, 520–521
4. Block B, Booth D, Carey F. 1992. Direct measurement of swimming speeds and depth of blue marlin. *Journal of Experimental Biology*. 166: 267–284
5. Bodmer S, Imark C. and Kneubühl M. 1999. Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *Inflamm. Res*. 48 (6), 296-300
6. Bulushi I, Poole S, Deeth H and Dykes G. 2009. Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation--a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 49 (4), 369-377
7. Chen H, Kung H, Chen W, Lin W, Hwang D, Lee Y, Tsai Y. 2008. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning. *Food Chemistry*. 106, 612–618
8. Crowther, J.R., 2009. The ELISA guidebook: Chapter 2, system in ELISA. Houmana press/Springer, N.Y., USA, 9-42
9. CSPI. 2005. Outbreak Alert. Closing the Gaps in Our Federal Food-safety Net
10. Dalgaard P, Emborg J, Kjolby A, Sorensen N. D, Ballin N. Z. 2008. Histamine and biogenic amines: formation and importance in seafood. Woodhead Publishing Ltd
11. Demoncheaux JP, Michel R, Mazenot C, Duflos G, Iacini C, de Laval F, Saware EM, Renard JC. 2012. A large outbreak of scombroid fish poisoning associated with eating yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) at a military mass catering in Dakar, Senegal. *Epidemiol Infect*. 140, 1008-1112
12. Du W. X, Lin C. M, Phu A. T, Cornell J. A, Marshall M. R. and Wie C. I. 2002. Development of biogenic amines in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*): Effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. *Journal of Food Science*. 67 (1), 292–301
13. EU Directive. 2005. Microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European, Commission Regulation (EC) No 2073/2005, L338/1
14. Economou V, Brett M. M, Papadopoulou C, Frillingos S. and Nichols T. 2007. Changes in histamine and microbiological analyses in fresh and frozen tuna muscle during temperature abuse. *Food Addit Contam*. 24(8), 820 - 832
15. European Food Safety Authority, (EFSA), 2010. Establishment and maintenance of routine analysis of data from the Rapid Alert System on Food and Feed. Technical Report. *EFSA Journal* 8 (1), 1–26 1449



16. Emborg J, Dalgaard P, Ahrens P. 2006. *Morganella psychrotolerans* sp. nov. a histamine-producing bacterium isolated from various seafoods. *Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2473-2479
17. Erkan N, Helle N, Ozden O. 2001. The content of biogenic amines in canned fish from Turkish market. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 114, 241–245
18. Favaro G, Pastore P, Saccani G. and Cavalli S. 2007. Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by ion chromatography and integrated pulsed amperometric detection on Au electrode. *Food Chemistry*, 105 (4), 1652 – 1658
19. FAO, 2005. Preservation techniques, FAO Fisheries and Aquaculture Department, Food and Aquaculture Organization of the United Nations
20. FAO, 2007a. The state of world fisheries and aquaculture 2006. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Food and Aquaculture Organization of the United Nations
21. FAO, 2007b. Future prospects for fish and fishery products. 4. Fish consumption in the European Union in 2015 and 2030. Part 1. European overview, FAO Fisheries Circular No. 972/4, Part 1, Food and Aquaculture Organization of the United Nations
22. FDA. 2001. Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guide. 3rd ed. Chap. 7.
23. FDA. 1996. Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guide
24. Guizani N, Al-Busaidy M, Al-Belushi I, Mothershaw A. and Rahman M. 2005. The effect of storage temperature on histamine production and the freshness of yellow fin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Res. Int.* 38, 215–222
25. Haard N. F. 1995. Composition and Nutritive Value of fish Proteins and other Nitrogen compounds. Fish and fishery products, composition, nutritive properties and stability
26. Hungerford J. M. 2010. Scombroid poisoning: a review. *Toxicon.* 56, 231–243
27. Hungerford J. M, Hollingworth T. A, Wekell M. M. 2001. Automated kinetics enhanced flow-injection method for histamine in regulatory laboratories: rapid screening and suitability requirements. *Analytica Chimica Acta* 438, 123-129
28. Hungerford J. M and Arefyev A. A. 1992. Flow-injection assay of enzyme inhibition using immobilized diamine oxidase. *Anal. Chim. Acta* 261, 351–359
29. Kan K, Ushiyama H, Shindo T, Saito K. 2005. Survey of histamine content in seafood on the market. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 46:127–132
30. Kanki M, Yoda T, Ishibashi M, Tsukamoto T. 2004. Photobacterium phosphoreum caused a histamine fish poisoning outbreak. *Int J Food Microbiol.* 92:79–87
31. Kanki M, Yoda T, Tsukamoto T, Baba E. 2007. Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (5), 1467-1473
32. Kim S. H, Field K. G, Morrissey M. T, Price R. J, Wei C. I and An H. 2001. Source and identification of histamine-producing bacteria from temperature-abused albacore. *Journal of Food Protection.* 64, 1035 – 1044
33. Konagaya Y, Kimura B, Ishida M, Fujii T. 2002. Purification and properties of a histidine decarboxylase from *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium. *Appl. Microbiol.* 92 (6), 1136 – 1142

34. Köse S, Kaklikkaya N, Koral S, Tufan B, Buruk K. C, Aydin F. 2011. Commercial test kits and the determination of histamine in traditional (ethnic) fish products-evaluation against an EU accepted HPLC method. *Food Chemistry*, 125 (4), 1490-1497
35. Lall S.P. 1995. Macro and trace elements in fish and shellfish. *Fish and Fishery Products, Composition, Nutritive Properties and Stability*. 187-213
36. Lapa-Guimaraes, J., & Pickova, J. (2004). New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *Journal of Chromatography A*, 1045(1–2), 223 – 232
37. Lehane L. and Olley J. 2000. Histamine fish poisoning revisited. *Food Microbiol.* 58, 1-37
38. Leuschner R. G. K, Hristova A, Robinson T. and Hugas M. 2013 The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) database in support of risk analysis of biogenic amines in food. *Journ. Food Compos. Analysis* 29, 37–42
39. Liu M, Li Y. G, Chou G. X, Cheng X. M, Zhang M. and Wang Z. T. 2007. Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb *Radix Salviae Miltiorrhizae*. *Journal of Chromatography A*. 1157 (1–2), 51 – 55
40. Lucas P. M, Wolken W. A, Claisse O, Lolkema J. S and Lonvaud-Funel A. 2005. Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Appl Environ Microbiol.* 71(3), 1417-1424
41. Magnusson J, Kull I, Rosenlund H, Håkansson N, Wolk A, Melén E, Wickman M. and Bergström A. 2013. Fish consumption in infancy and development of allergic disease up to age 12. *Am J Clin Nutr.* 97(6), 1324-1330
42. Maintz L and Novak N. 2007. Histamine and histamine intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* 85 (5), 1185-1196
43. Martín B, Garriga M, Hugas M, Bover-Cid S, Veciana-Nogués M. T and Aymerich T. 2006. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *Int J Food Microbiol.* 107(2), 148-158
44. Muscarella M, Magro S. L, Campaniello M, Armentano A. and Stacchini P. 2012. 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
45. NAS, National Academy of Sciences, Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, 1991. *Seafood Safety*. National Academy Press
46. Nguyen D. T. T, Guillarme D, Heinisch S, Barrioulet M. P, Rocca J. L and Rudaz S. 2007. High throughput liquid chromatography with sub-2  $\mu$  m particles at high pressure and high temperature. *Journal of Chromatography A*, 1167 (1), 76 – 84
47. Onal A. 2007. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.* 103, 1475–1486
48. Orrell T. M, Collette B. B, Johnson G. D. 2006. Molecular data support separate Scombroid and Xiphoid Clades. *Bulletin of Marine Science* 79 (3), 505–519
49. Rossano R, Mastrangelo L, Ungaro N. and Riccio P. 2006. Influence of storage temperature and freezing time on histamine level in the European

- anchovy *Engraulis encrasicolus* (L., 1758): A study by capillary electrophoresis. *Journ. Chromatogr.* 830 (1), 161-164
50. Papavergou E. J, Savvaidis I. N and Ambrosiadis I. A. 2012. Levels of biogenic amines in retail market fermented meat products. *Food Chem.* 135 (4), 2750-2755
  51. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), 2009. Annual Report 2008. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg
  52. Ruiz-Capillas C. and Moral A. 2004. Free amino acids and biogenic amines in red and white muscle of tuna stored in controlled atmospheres. *Amino acids.* 26, 125–132
  53. Santos W. C, Souza M. R, Cerqueira M. and Gloria M. B. A. 2003. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 degrees C. *Food Chemistry.* 81 (4), 595–606
  54. Sattler J, Klocker J, Merz C, Stalzer B, Bodmer, E. 1999. Disease concept of enteral-induced histaminosis. *Inflamm. Res.*
  55. Steinhoff M, Griffiths C, Church M, Luger TA. Histamine. 2004. Rook's textbook of dermatology. 9, 50-52
  56. Sumner J. and Ross T. 2002. A semi-quantitative seafood safety risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 77, 55–59
  57. 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. *J Food Prot.* 67:407–412
  58. Tsai Y-H, Lin C-Y, Cang S-C, Chen S-C, Kung H-F, Wei C-I, Hwang D-F. 2005. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan. *Food Microbiol.* 22:461–467
  59. Wilson B. J, Musto R. J, Ghali W. A. 2012. A case of histamine fish poisoning in a young atopic woman. *Gen. Intern. Med.* 27 (7), 878-881
  60. Vosikis V, Papageorgopoulou A, Economou V, Frilingos S, Papadopoulou C. 2008. Survey of the histamine content in fish samples randomly selected from the Greek retail market, *Food Additives and Contaminants* 1, 122-129

### **Ελληνική βιβλιογραφία**

1. Νεοφύτου Χ. 1997. *Ιχθυολογία*. University Studio Press
2. Παπαναστασίου Δ. Π. 1990. *Τεχνολογία και Ποιοτικός Έλεγχος Αλιευμάτων*. Εκδόσεις Ιων
3. Belitz H. D, Grosch W, Schieberle P. 2006. *Χημεία τροφίμων*, 3η έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα

### **Διαδουκτιακοί τόποι**

1. <http://allergiologiko.tribalcube.gr/faq/food-allergy-fish.html> - 17/04/2013
2. <http://www.bbc.co.uk/news/science-environment-12334859> - 25/06/2013
3. <http://www.eufic.org/article/el/artid/freezing-foods-quality-safety/> - 03/03/2013
4. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-consumption/en> - 28/05/2013

5. <http://faostat.fao.org/site/610/DesktopDefault.aspx?PageID=610#ancor> - 14/05/2013
6. <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm070455.htm> - 07/05/2013
7. <http://www.fishbase.gr> – 10/10/2012
8. <http://www.foodbites.eu/j15/trofima/epexergasia/725-canning> - 10/03/2013
9. [http://www.gcsf.gr/index.asp?a\\_id=368#link6](http://www.gcsf.gr/index.asp?a_id=368#link6) – 15/03/2013
10. [http://www.moh.gov.cy/MOH/SGL/SGL.nsf/All/AB824B068C7A1777C2257B8E0027B132/\\$file/%CE%95%CF%84%CE%AE%CF%83%CE%B9%CE%B1%20%CE%88%CE%BA%CE%B8%CE%B5%CF%83%CE%B7%20%CE%93%CE%A7%CE%9A%202012.pdf](http://www.moh.gov.cy/MOH/SGL/SGL.nsf/All/AB824B068C7A1777C2257B8E0027B132/$file/%CE%95%CF%84%CE%AE%CF%83%CE%B9%CE%B1%20%CE%88%CE%BA%CE%B8%CE%B5%CF%83%CE%B7%20%CE%93%CE%A7%CE%9A%202012.pdf) [www.greenfacts.org/en/fisheries/1-2/06-fish-consumption.htm](http://www.greenfacts.org/en/fisheries/1-2/06-fish-consumption.htm) - 20/05/2013
11. <http://www.iatronet.gr/diatrofi/astheneies-diatrofi/article/691/psari-kai-kardiopatheies.html> - 07/04/2013
12. [http://www.incardiology.gr/odigies/psari\\_genika.htm](http://www.incardiology.gr/odigies/psari_genika.htm) - 13/05/2013
13. [http://nchfp.uga.edu/how/freeze/freezer\\_shelf\\_life.html](http://nchfp.uga.edu/how/freeze/freezer_shelf_life.html) - 09/06/2013
14. <http://www.oceanlight.com> – 23/02/2013
15. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=F88ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403> – 13/10/2012
16. <http://seafood.ucdavis.edu/pubs/smoking.htm> - 11/04/2013
17. <http://www.tovima.gr/society/article/?aid=246603> - 03/06/2013

## Παράρτημα

Στους Πίνακες 1, 4 και 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη φωτομέτρηση των προτύπων δειγμάτων στις 3 φάσεις του πειράματος, τα οποία και οδήγησαν στην κατασκευή της πρότυπης καμπύλης για κάθε φάση. Στους Πίνακες 2, 3, 5, 6, 8 και 9 παρουσιάζονται οι οπτικές απορροφήσεις για κάθε δείγμα και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις εξισώσεις των πρότυπων καμπυλών και την απολογαρίθμηση που ακολούθησε για την εύρεση της συγκέντρωσης.

**Πίνακας 1:** Αποτελέσματα προτύπων δειγμάτων (φάση 1<sup>η</sup>)

### Πρότυπα δείγματα

<u>Συγκέντρωση</u>	<u>Οπτική απορρόφηση</u>
0	2,347
0,5	2,141
1,5	2,071
5	1,361
15	1,021
50	0,687
<u>Οπτική απορρόφηση (%)</u>	
100	
91	
88	
58	
43	
29	

<u>Ln(x)</u>	<u>Συγκέντρωση (x) προτύπων</u>
-1,01	0,36
-0,40	0,67
-0,19	0,82
1,85	6,34
2,87	17,58

**Πίνακας 2:** Αποτελέσματα πειραματικής διαδικασίας για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης ισταμίνης (φάση 1<sup>η</sup>)

**Δείγματα ψαριών**

<b><u>Οπτική απορρόφηση δειγμάτων</u></b>	<b><u>Οπτική απορρόφηση δειγμάτων (%)</u></b>
1,946	100
1,828	94
1,711	88
2,401	124
2,341	120
1,986	102
2,05	105
1,862	96

**Πίνακας 3:** Συγκέντρωση ισταμίνης στα δείγματα ψαριών (φάση 1<sup>η</sup>)

**Δείγματα ψαριών**

<b><u>Ln(x)</u></b>	<b><u>Συγκέντρωση (x)</u></b>
-1,54	0,21
-1,04	0,35
-0,55	0,58
-3,53	0,03
-3,20	0,04
-1,71	0,18
-1,95	0,14
-1,21	0,30

**Πίνακας 4:** Αποτελέσματα προτύπων δειγμάτων (φάση 2<sup>η</sup>)

**Πρότυπα δείγματα**

<b><u>Συγκέντρωση</u></b>	<b><u>Οπτική απορρόφηση</u></b>
0	1,899
0,5	1,753
1,5	1,504
5	1,077
15	0,737
50	0,555
<b><u>Οπτική απορρόφηση (%)</u></b>	
100	
92	

79	
57	
39	
29	

<u>Ln(x)</u>	<u>Συγκέντρωση (x) προτύπων</u>
-1,24	0,29
-0,69	0,50
0,21	1,24
1,74	5,70
2,99	19,88
3,68	39,80

**Πίνακας 5:** Αποτελέσματα πειραματικής διαδικασίας για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης ισταμίνης (φάση 2<sup>η</sup>)

**Δείγματα ψαριών**

<u>Οπτική απορρόφηση δειγμάτων</u>	<u>Οπτική απορρόφηση δειγμάτων (%)</u>
1,74	92
1,473	78
1,67	88
1,448	76
1,862	98
1,281	67
1,576	83
1,629	86
1,65	87
1,362	72
1,533	81
1,839	97
1,636	86
2,444	129
1,39	73
1,342	71
0,881	46
1,492	79
1,155	61
0,626	33
1,253	66
1,377	73
1,341	71
1,545	81

**Πίνακας 6:** Συγκέντρωση ισταμίνης στα δείγματα ψαριών (φάση 2<sup>η</sup>)

**Δείγματα ψαριών**

<b><u>Ln(x)</u></b>	<b><u>Συγκέντρωση (x)</u></b>
-0,66	0,52
0,31	1,37
-0,41	0,67
0,41	1,50
-1,11	0,33
1,02	2,76
-0,06	0,94
-0,26	0,77
-0,33	0,72
0,72	2,05
0,09	1,10
-1,02	0,36
-0,28	0,75
-3,23	0,04
0,62	1,85
0,79	2,21
2,48	11,91
0,24	1,28
1,48	4,38
3,41	30,23
1,12	3,06
0,66	1,94
0,80	2,22
0,05	1,05

**Πίνακας 7:** Αποτελέσματα προτύπων δειγμάτων (φάση 3<sup>η</sup>)

**Πρότυπα δείγματα**

<b><u>Συγκέντρωση</u></b>	<b><u>Οπτική απορρόφηση</u></b>
0	2,347
0,5	2,141
1,5	2,071
5	1,361
15	1,021
50	0,687

<b><u>Οπτική απορρόφηση (%)</u></b>	
100	
91	
88	
58	



43	
29	

<u>Ln(x)</u>	<u>Συγκέντρωση (x) προτύπων</u>
-1,01	0,36
-0,40	0,67
-0,19	0,82
1,85	6,34
2,87	17,58
3,82	45,55

**Πίνακας 8:** Αποτελέσματα πειραματικής διαδικασίας για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης ισταμίνης (φάση 3<sup>η</sup>)

### Δείγματα ψαριών

<u>Οπτική απορρόφηση δειγμάτων</u>	<u>Οπτική απορρόφηση δειγμάτων (%)</u>
2,233	95
2,002	85
2,058	88
2,326	99
2,289	98
2,384	102
2,525	108
2,177	93
2,788	119
2,906	124
2,817	120
2,867	122
1,676	71
2,94	125
2,299	98
2,636	112
2,241	95
2,371	101

**Πίνακας 9:** Συγκέντρωση ισταμίνης στα δείγματα ψαριών (φάση 3<sup>η</sup>)

### Δείγματα ψαριών

<u>Ln(x)</u>	<u>Συγκέντρωση (x)</u>
-0,68	0,51
-0,01	0,99
-0,17	0,84

-0,95	0,39
-0,84	0,43
-1,12	0,33
-1,53	0,22
-0,52	0,60
-2,29	0,10
-2,63	0,07
-2,37	0,09
-2,52	0,08
0,93	2,55
-2,73	0,07
-0,87	0,42
-1,85	0,16
-0,70	0,50
-1,08	0,34